

**SUR L'UTILISATION DU VITELLUS
CHEZ QUELQUES SALMONIDÉS.
ÉTUDE ULTRASTRUCTURALE
DE LA COUCHE SYNCYTIALE VITELLINE
DE L'ÉCLOSION A LA STARVATION.**

THÈSE
présentée à la Faculté des sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur es sciences biologiques

par
Claude WALZER
de
CAROUGE

Thèse No 1756

1976

Genève
Service Rapide Offset
1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**SUR L'UTILISATION DU VITELLUS
CHEZ QUELQUES SALMONIDÉS.
ÉTUDE ULTRASTRUCTURALE
DE LA COUCHE SYNCYTIALE VITELLINE
DE L'ÉCLOSION A LA STARVATION.**

THÈSE
présentée à la Faculté des sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par
Claude WALZER
de
CAROUGE

Thèse No 1756

Genève
Service Rapide Offset
1978

La Faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs H. HUGGEL, professeur ordinaire et directeur de thèse, N. SCHOENENBERGER, professeur (Université de Lausanne) et E. CHAROLLAIS, chargé de cours (Département de Biochimie – Genève), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 8 juillet 1976

Le Doyen:
Jean Muller

Thèse No 1756



A la mémoire de mon père

A ma mère

A ma femme, Micheline

A Séverine et à Laure

REMERCIEMENTS

J'exprime ma vive gratitude au Professeur H.J. HUGGEL qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui m'a conseillé tout au long de cette recherche.

Je remercie, tout particulièrement, le Professeur N. SCHOENENBERGER de m'avoir initié aux différentes techniques de la microscopie électronique et de n'avoir ménagé pour moi ni son temps, ni ses conseils.

Ma gratitude va également aux Professeurs E. CHAROLLAIS et J.P. TRINKAUS qui m'ont permis de bénéficier de leurs conseils et de leur expérience.

Que tous mes amis du Laboratoire trouvent ici l'expression de ma reconnaissance, tout spécialement Madame Mireille TSCHOPP, photographe, et Monsieur E. NAGY, responsable du M.E.B.

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	6
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	8
1. Microscopie optique	8
2. Microscopie électronique à transmission	9
3. Cytochimie	9
4. Digestion enzymatique	11
5. Détection des polysaccharides	12
6. Marquage de l'espace extracellulaire	12
7. Critique des méthodes	14
<u>RESULTATS</u>	16
1. Organisation générale de la couche syncytiale vitelline à l'éclosion	16
2. Evolution de la couche syncytiale vitelline pendant la régression	17
3. La zone de vitellolyse	18
4. La zone cytoplasmique	22
5. Décharge des produits issus du vitellus dans la circulation vitelline	30
<u>DISCUSSION</u>	34
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	44

INTRODUCTION

L'oeuf des Poissons osseux est dit télolécithe, c'est-à-dire caractérisé par un vitellus abondant. Cette condition, qui d'ailleurs n'est pas le propre des Téléostéens puisque nous la rencontrons également chez les Céphalopodes, les Sélaciens et les Sauropsidés, va entraîner une segmentation partielle discoïdale. De ce fait les oeufs de ces groupes seront dits méroblastiques.

La morphogénèse permet, tout d'abord, la mise en place d'une calotte cellulaire au pôle animal (Oppenheimer, 1947; Devillers, 1961; Balinsky, 1970; Lentz et Trinkaus, 1967; Ballard, 1973 b). Puis la différenciation se poursuit par une migration des cellules de la calotte sur tout le pourtour de la sphère vitelline (Ballard et Dodes, 1968; Trinkaus, 1973; Ballard, 1973 a, b, c) et par la constitution d'un embryon dans un des quadrants de l'oeuf (Ballard, 1973 a, b, c; Wourms, 1972).

Ensuite l'organogénèse de l'embryon se continue avec comme phase importante visible macroscopiquement : apparition du pigment de la rétine, formation de la circulation vitelline.

La fin de l'organogénèse se marque par la perte du "chorion", enveloppe qui protège l'embryon, et l'avènement de l'éclosion. On entre dans la phase de croissance de l'embryon au détriment de la sphère vitelline (Smith, 1957; Philips et al, 1958) qui, elle, subit la régression. A l'éclosion, l'embryon avec sa vésicule vitelline prend le nom d'alevin. Pendant toute la période de régression, l'alevin ne prendra aucune nourriture extérieure.

Le schéma 1 montre l'organisation de la vésicule vitelline à l'éclosion. Il est important de noter la disposition périphérique d'une couche cytoplasmique qui entoure le vitellus coalescent. Cette couche, appelée couche syncytiale vitelline, ou encore périblaste ou symplasma, se différencie dès la blastula dans l'oeuf des Téléostéens (Trinkaus, 1951) et se dispose entre l'embryon et le vitellus. Considérée comme un

élément important de l'épibolie (Trinkaus, 1949, 1951, 1973), elle pourrait aussi participer à une fonction digestive du vitellus (Van der Ghinst, 1935; Yamagami, 1960 a et b; Yamamoto, 1967).

Après l'éclosion, comme il ressort du schéma 1, la couche syncytiale vitelline n'est plus en contact direct avec l'embryon. Pendant l'organogenèse, des membranes extraembryonnaires se sont interposées entre l'embryon et la couche syncytiale vitelline avec notamment la splanchnopleure qui a différencié des vaisseaux vitellins. Ce sont eux qui assurent la liaison entre le sac vitellin et l'embryon.

Nous avons choisi d'étudier, par la microscopie électronique, l'organisation de la couche syncytiale vitelline pendant la phase de croissance de l'embryon.

Chez les Salmonidés, cette période a été reconnue comme celle où l'utilisation du vitellus était la plus marquée (Philips et al., 1958; Malcom Love, 1970) et où le compartiment protéique était le plus activement métabolisé (Ando, 1965).

Notre but était de savoir si l'ultrastructure pouvait fournir de plus amples renseignements sur la participation de la couche syncytiale vitelline à la résorption du vitellus.

D'une manière plus précise, il était intéressant de connaître :

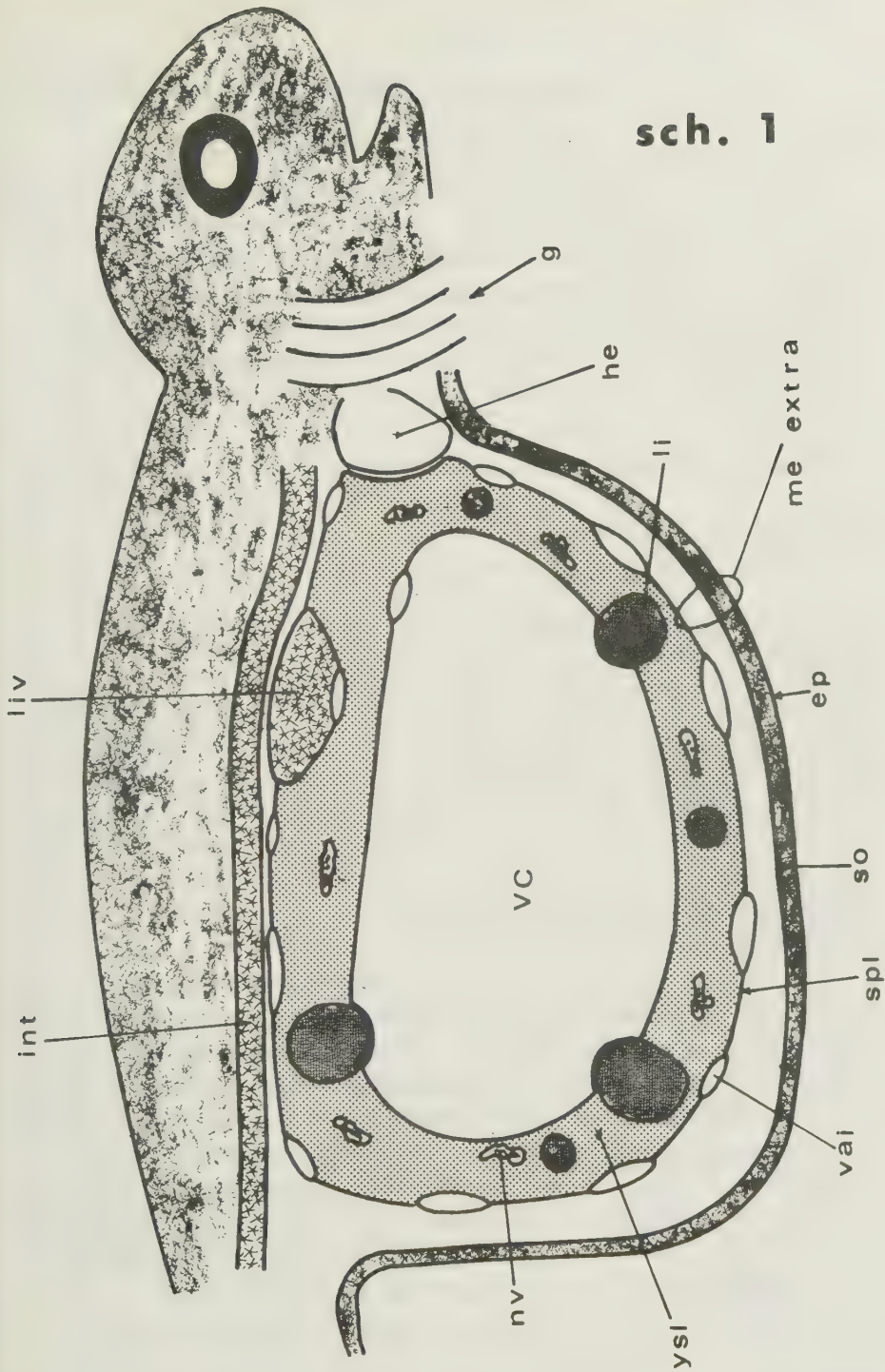
- L'organisation générale de la couche syncytiale vitelline.
- La nature de la séparation entre vitellus coalescent et couche syncytiale vitelline.
- La manière dont les plaquettes vitellines se forment à partir du vitellus coalescent.
- Comment sont dégradées ces plaquettes dans la couche syncytiale vitelline.
- La participation de la couche syncytiale vitelline à une éventuelle fonction sécrétoire.
- Comment les produits, issus du sac vitellin, se déversent dans les vaisseaux vitellins.

Schéma 1

Schéma de l'organisation de la vésicule vitelline pendant la la régression.

Légende :	li	huile
	int	intestin
	g	branchie
	me extra	membranes extraembryonnaires
	ep	épiderme
	so	somatopleure
	spl	splanchnopleure
	vai	vaisseaux
	ysl	couche syncytiale vitelline ou périblaste
	nv	noyaux vitellins ou mérocytes
	liv	foie
	he	coeur
	VC	vitellus coalescent

sch. 1



MATERIEL ET METHODES

Les oeufs fécondés de Truite arc-en-ciel, *Salmo gairdneri* Richardson et de Truite de Rivière, *Salmo fario trutta* L., proviennent d'une pisciculture des environs de Genève. Ils sont placés dans des bacs d'élevage à température atmosphérique et élevés selon les méthodes usuelles.

1. Microscopie optique

Histologie normale

Des oeufs et alevins sont fixés dans les liquides suivants de fixation :
Bouin, Formol 10 %, Dubosq-Brazil (Dubois, 1966; Gabe, 1968), liquide de Da Fano (Dupois, 1964). Ensuite ils sont déshydratés et emparaffinés selon les méthodes usuelles. Des coupes de 7 à 10 μ d'épaisseur sont colorées par l'hémalum éosine, le trichrome de Mallory, le PAS, le Feulgen et l'azan Haidenhain.

Autoradiographie sur coupes épaisses

Nous injectons, dans la vésicule vitelline de *Salmo gairdneri*, de la thymidine-méthyl- H^3 (activité spécifique 27,7 Ci/mM) et de l'uridine-5- H^3 (activité spécifique 29 Ci/mM) tritiées 10 et 29 jours après l'éclosion (10 μ l contenant 10 μ c), à l'aide d'un microtitrateur (Beckman, 153). Après différents temps d'incubation, les alevins sont fixés au Dubosq-Brazil, coupés à 7 μ et collés sur lames préalablement gélatinées. Des plaques AR 10 (Kodak) fournissent l'émulsion. Nous développons et colorons les autoradiographies selon les recommandations de Gude (1968).

2. Microscopie électronique à transmission

Après différents essais de liquides de fixation, nous avons retenu celui de Kalt et Tandler (1971), modifié comme suit :

1. Fixation par immersion de l'alevin in toto, pendant 6 heures, à 4°C, dans les concentrations d'aldéhydes suivantes : glutaraldéhyde 3%, paraformaldéhyde 2%, diméthylsulfoxyde (DMSO) 2,5%, acroléine 1%. Nous ajoutons 0,05% de CaCl_2 . Ce mélange est tamponné à pH 7,4 avec du cacodylate de sodium 0,1 M .
2. Dissection de la vésicule vitelline et prélèvement des morceaux de tissus.
3. Dans du nouveau fixateur, les blocs disséqués sont laissés pendant 3 heures supplémentaires à température du laboratoire.

A part la postfixation à l'acide osmique 2% raccourcie à 3 heures, le lavage, la déshydratation et l'enrobage sont pratiqués comme décrits par Kalt et Tandler (1971). Les blocs, enrobés dans l'épon 812 (Luft, 1961) ou dans le ERL 4206 (Spurr, 1969), sont alors coupés sur un ultramicrotome Reichert OMU2 avec des couteaux de verre afin de repérer un endroit favorable pour l'examen à haute résolution.

Les coupes semi-fines de $0,5 \mu$ à 1μ sont colorées selon le procédé de Richardson et al. (1960). L'examen optique s'effectue sur un microscope Wild M20, muni d'une chambre photographique.

Les coupes fines d'environ $800 \text{ \AA}$, récoltées sur des grilles en cuivre 300 "meshes", sont alors contrastées au citrate de plomb (Reynolds, 1963) et examinées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi 7S ou AEI EM 6B.

3. Cytochimie

Nous avons employé 3 préfixateurs différents.

1. Paraformaldéhyde 4% dans du tampon cacodylate 0,1 M , pH 7,4.
2. Glutaraldéhyde 2% dans du tampon cacodylate 0.1 M ,

pH 7,4. Du fait que la glutaraldéhyde contient souvent des impuretés, nous l'avons purifiée selon la méthode d'Anderson (1967) de manière à ne laisser subsister que la forme monomère de la glutaraldéhyde (Hopwood, 1972).

3. Mélange glutaraldéhyde 1,25% et paraformaldéhyde 1% dans le même tampon cacodylate 0,1 M , pH 7,4.

L'alevin entier est fixé par immersion, à 4°C, avec l'un de ces trois liquides pendant 30 minutes. La vésicule vitelline est alors disséquée en blocs de 1 à 2 mm³ qui sont placés dans du fixateur neuf durant 30 minutes supplémentaires. Ces blocs sont généralement lavés pendant une nuit dans du tampon cacodylate 0,1 M , additionné de saccharose 7%. Puis, ces pièces de tissu sont débitées en tranches de 40 µ soit avec un chopper (Smith et Farquhar, 1965) soit avec un microtome à congélation (Jung). Dans ce dernier cas, le lavage qui intervient juste avant cette étape s'effectue en présence de DMSO, connue pour ses propriétés de cryoprotecteur, selon la méthode d'Helminen et Ericsson (1970).

Les tranches de 40 µ sont ensuite soumises à l'un des différents milieux d'incubation du tableau I suivant l'activité enzymatique recherchée, tout d'abord sans agent chimique de révélation afin que le substrat pénètre dans les tissus. Cette étape constitue la préincubation et dure de 30 à 60 minutes. Les tranches sont ensuite soumises au milieu complet d'incubation contenant cette fois-ci l'agent chimique de révélation afin que celui-ci se combine avec l'un des produits libérés par l'action de l'enzyme sur le substrat.

Après incubation, les tranches sont rincées plusieurs fois dans le tampon cacodylate 0,1 M , pH 7,4, additionné de saccharose 5%, postfixées à l'acide osmique 2% (2 heures), déshydratées et enrobées dans du ERL 4206 (Spurr, 1969).

Les incubations de contrôle sont réalisées soit en absence de substrat, soit en ajoutant un inhibiteur au milieu complet d'incubation (voir tableau I), soit en préchauffant les tranches de tissu à 100°C pendant 5 minutes et en incubant, ensuite, dans le milieu complet.

La détection enzymatique de la Glucose-6-phosphatédéshydrogénase se réalise uniquement au niveau de la microscopie opti-

TABLEAU I

Milieux d'incubation

Enzyme	Substrat	Agent chimique de révélation*	Tampon	Sels **	Durée d'incubation	Inhibiteur ***	Auteur
Phosphatase acide	β -glycérophosphate	Nitrate de plomb	tris-maléate pH 5,0	---	30 à 60 minutes	NaF	Barka et Anderson (1962)
Phosphatase alcaline	β -glycérophosphate	Nitrate de plomb	tris-maléate pH 9,0	MgCl ₂	30 à 60 minutes	---	Hugon et Borgers (1966)
Glucose-6-phosphatase	Glucose-6-phosphate	Nitrate de plomb	tris-maléate pH 6,7	---	45 minutes	---	Ericsson (1966)
Thiaminepyrophosphatase	Thiaminepyrophosphate	Nitrate de plomb	tris-maléate pH 7,2	MnCl ₂	30 à 45 minutes	---	Novikoff et al. (1971)
Peroxydase	DAB réduite + H ₂ O ₂	DAB oxydée	Propanediol pH 9,7	---	1 à 2 heures	KCN ou aminotriazole	Beard et Novikoff (1969) Novikoff et al. (1972)

* L'agent chimique de révélation, que ce soit le nitrate de plomb ou la Diaminobenzidine (DAB), est ajouté au milieu même d'incubation.

** Les sels sont incorporés au milieu d'incubation parce qu'ils favorisent ou soulignent la formation du précipité qui visualise la réaction.

*** Les inhibiteurs sont ajoutés au milieu complet d'incubation et doivent supprimer, en principe, toute réaction due à l'enzyme recherchée.

que et utilise la méthode de Meijer (1972, 1974) qui permet de limiter la diffusion de l'enzyme habituellement localisée dans la portion soluble du cytoplasme.

On prépare les membranes semi-perméables et les vaisseaux d'incubation comme recommandé par Meijer (1972). On coule ensuite le milieu d'incubation auquel on a ajouté de l'agar 4% dans ces vaisseaux d'incubation et sur la membrane semi-perméable fixée à l'autre extrémité du vaisseau. On laisse le milieu d'incubation se solidifier, puis on place les vaisseaux d'incubation dans le cryostat.

Des alevins entiers sont plongés dans de l'isopentane, préalablement refroidi à l'azote liquide, puis coupés à l'aide du cryostat en tranches de 15 microns. On sèche soigneusement la surface de la membrane semi-perméable avec un papier filtre, ainsi que les coupes, avant de disposer ces dernières sur la surface de la membrane semi-perméable. Les coupes ainsi placées sont incubées à 37°C pendant 1 heure. Ensuite le milieu d'incubation est retiré des vaisseaux et les membranes, avec les coupes, sont fixées à 20°C dans des vapeurs de paraformaldéhyde pendant 10 minutes. On découpe ensuite la membrane tout autour des coupes et on sèche le tout dans un dessiccateur pendant 5 minutes. Les sections sont alors disposées sur des lames et montées avec de la gélatine glycérinée.

4. Digestion enzymatique

Nous n'avons utilisé que des tissus inclus en épon, bien que Monneron et Bernhard (1966) recommandent l'enrobage au méthacrylate (résine soluble dans l'eau). Toutefois les phénomènes importants de rétraction observés, ainsi que la mauvaise résolution surtout au-delà de 15000 fois, nous ont fait préférer la technique des tissus inclus en épon. Avant de procéder à la flottaison des coupes sur la solution enzymatique, il est nécessaire d'effectuer un traitement à l'acide périodique 1% afin de retirer l'osmium des coupes (Monneron et Bernhard, 1966). Si l'on omet cette étape, on n'arrive pas à visualiser une digestion quelconque.

Les enzymes testées sont les suivantes :

- 1) Pronase : 0,5 % à 1 % dans de l'eau distillée à pH 7,4 pendant 30 minutes à 2 heures à 37°C (Monneron et Bernhard, 1966).
- 2) Lipase : 1 % pendant 30 minutes à 1 heure dans un tampon tris-HCl 0,2 M, pH 7,5 à 37°C (Tachibana, 1975).
- 3) Pronase-lipase : d'abord digestion à la pronase 1 % pendant 1 heure (voir ci-dessus), puis lavage et finalement incubation sur la solution de lipase 1 % pendant 45 minutes.

Dans les trois cas, les coupes sont contrastées au citrate de plomb selon Reynolds (1963).

On pratique généralement en comparant coupes incubées sans enzyme avec celles qui en ont reçue et en modifiant le temps de digestion.

5. Détection des polysaccharides

Cette réaction de mise en évidence des polysaccharides se réalise sur coupes fines montées sur des grilles en or (Thiéry, 1967).

On rompt les glycols vicinaux par l'action de l'acide périodique. Puis on lie les groupements aldéhydiques libérés à de la thiocarbohydrazide (TCH). Ce dernier composé est révélé pour la microscopie électronique par un traitement au protéinate d'argent.

Nous avons utilisé des temps de flottaison sur la TCH de 30 à 40 minutes pour la mise en évidence du β -glycogène.

Les témoins subissent l'action de l'eau oxygénée (3 à 5 %) qui ne rompt pas les glycols vicinaux (le reste de la procédure étant appliqué intégralement). On peut aussi omettre l'action de la TCH après l'acide périodique.

6. Marquage de l'espace extracellulaire

Nous avons, conjointement, employé plusieurs procédés.

1. Peroxydase de raifort

Dissoute dans un Ringer à la concentration de 1%, elle était soit injectée à l'intérieur du sac vitellin avec un microtitrateur (Beckman 153), soit disposée comme milieu extérieur. Dans les deux cas, la vésicule vitelline était débarrassée de son épiderme.

Après 15, 30, 45 et 60 minutes de traitement, les alevins étaient fixés au Karnovsky (1965), débitées en tranches de 40μ et la peroxydase exogène révélée selon la méthode de Graham et Karnovsky (1966).

2. Nitrate de lanthane

Sur des alevins entiers ou sur des vésicules vitellines avec ou sans épiderme, nous appliquions le procédé de Revel et Karnovsky (1967).

Une solution de nitrate de lanthane (3%) est amenée à pH 7,8 avec du NaOH 0,01 N. L'addition de la base doit être exécutée avec prudence jusqu'à l'apparition d'une légère opalescence à pH 7,8, pH auquel l'hydroxyde de lanthane devient insoluble. On ajoute cette solution de lanthane au liquide de postfixation de telle manière que la concentration de lanthane soit comprise entre 0,5 et 1%.

On ne connaît pas la modalité d'action du nitrate de lanthane.

3. Rouge de ruthénium

Surtout étudié par Luft (1971 a, b et c), le rouge de ruthénium est utilisé comme marqueur de l'espace extracellulaire. Cependant on l'a fréquemment employé pour mettre en évidence les mucopolysaccharides, puisque Luft (1971 a) préconise que c'est avec ces substances qu'il réagit le plus fortement.

Nous avons employé les méthodes de purification et d'application telles qu'elles sont décrites par Luft (1971 a).

7. Critiques des méthodes

Concernant l'emploi des aldéhydes, il faut se souvenir que leur mécanisme d'action est peu compris surtout lorsqu'on connaît le nombre de paramètres qui peuvent influencer sur l'image finale : osmolarité, température, durée de fixation, choix du fixateur, pH, présence de sels minéraux, tampons (Hopwood, 1972, 1974; Jones, 1972; Rasmussen, 1974; Pentilla et al., 1974; Busson-Mabillot, 1971, 1972).

Le fait de devoir concilier, en cytochimie ultrastructurale, la structure et l'activité enzymatique ne va pas sans problème. En effet, on sait que les aldéhydes sont des inhibiteurs de l'activité enzymatique (de 60 à 100%; Hopwood, 1967, 1972; Anderson, 1967; Miller et Palade, 1964; Quioco et Richards, 1966; Ernst et al., 1970; Schejter et al., 1970).

La glutaraldéhyde réagit, par exemple, avec le groupe ϵ -amino de la lysine et crée ainsi une base de Schiff. Or, si cet acide aminé se trouve au site actif d'une enzyme, il ne fait aucun doute que toute l'activité sera supprimée (Quioco et Richards, 1966; Bowes et Cater, 1968).

Certains auteurs (Quioco et Richards, 1964; Hopwood, 1969) pensent que la liaison glutaraldéhyde-molécule de protéine permet l'élaboration d'une trame moléculaire dense qui s'opposerait par la suite à la diffusion du substrat dans le tissu. La formaldéhyde, qui inhibe moins l'activité enzymatique que la glutaraldéhyde (Ernst et Philpott, 1970; Hopwood, 1972), a malheureusement l'inconvénient de moins bien préserver l'ultrastructure.

Il est important de se souvenir que l'agent chimique de révélation ajouté au milieu (bien souvent un sel de plomb) sera un inhibiteur supplémentaire de l'activité enzymatique recherchée.

L'élaboration d'une trame moléculaire, opérée par la polymérisation des aldéhydes, peut aussi empêcher la pénétration du substrat et nécessite souvent une pré-incubation avec le substrat pour le faire diffuser dans tout le tissu, mais sans l'agent chimique de révélation (Thiéry, 1974; Holt, 1974). La méthode même d'incubation des coupes en milieu aqueux n'est valable que pour autant que l'enzyme se trouve dans la portion

insoluble du cytoplasme (liée fermement à des membranes ou dans des organites). Dans le cas contraire, il faut éviter à tout prix le milieu aqueux et recourir par exemple à la technique des membranes semi-perméables de Meijer (1972).

Il est nécessaire et indispensable d'effectuer des coupes témoins en absence de substrat ou en ajoutant au milieu complet un inhibiteur spécifique de l'activité enzymatique recherchée. Quant aux expériences de digestion enzymatique sur coupes fines incluses dans l'épon, il faut se souvenir que ces résines sont insolubles dans l'eau et qu'on ne comprend pas encore d'une manière parfaite comment s'effectue la digestion enzymatique. On suppose qu'elle débute à l'interface milieu d'incubation - coupes épon et qu'elle se propage de proche en proche (Monneron et Bernhard, 1966; Schrével et al., 1974).

RESULTATS

1. ORGANISATION GENERALE DE LA COUCHE SYNCYTTIALE VITELLINE A L'ECLOSION

La vésicule vitelline de l'alevin de Truite présente, en son centre, une masse de vitellus coalescent entourée, elle-même, d'une couche cytoplasmique de nature syncytiale, la couche syncytiale vitelline (CSV; schéma 1). Puis, en se dirigeant vers l'extérieur, on rencontre 3 autres couches qui constituent les membranes extraembryonnaires : la splanchnopleure, porteuse des capillaires vitellins, la somatopleure et l'épiderme. L'examen de la CSV, sur coupes semi-fines, a permis de distinguer deux régions d'épaisseur à peu près identique (20 à 30 μ à l'éclosion).

- L'une, qui fait suite directement au vitellus coalescent, contient des corps de forme ovoïde à ronde, de dimension variable, de même texture que le vitellus compact, baignant dans du hyaloplasme.
- L'autre, poursuit cette première zone, sans délimitation marquée. Elle ne possède plus ces corps ronds et a un aspect tout à fait cytoplasmique.

1.1. La zone de vitellolyse (schéma 2)

Les corps, qui sont disposés dans cette première subdivision, semblent provenir du découpage du vitellus coalescent et représentent les plaquettes vitellines déjà mentionnées dans d'autres travaux (Kunz, 1964; Nittinger, 1967; Vernier et Sire, 1977 b). Au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la masse vitelline, ces plaquettes diminuent de diamètre, puis disparaissent complètement. C'est cette observation qui nous a amené à donner le nom de zone de vitellolyse à cette première portion de la CSV.

1.2. La zone cytoplasmique (schéma 3)

Cette deuxième partie de la CSV contient, basalement, un système réticulaire ou fibrillaire. C'est lui qui semble

Schéma 2

Représentation schématique de la couche syncytiale vitelline à l'éclosion.

Des plaquettes (P) se sont formées à partir du vitellus coalescent (CY) et sont disposées dans la zone de vitellolyse (VZ). Un système fibrillaire ou réticulaire (RS), orienté parallèlement à la sphère vitelline, semble empêcher les plaquettes de la zone de vitellolyse de passer dans la zone cytoplasmique (CZ).

Schéma 3

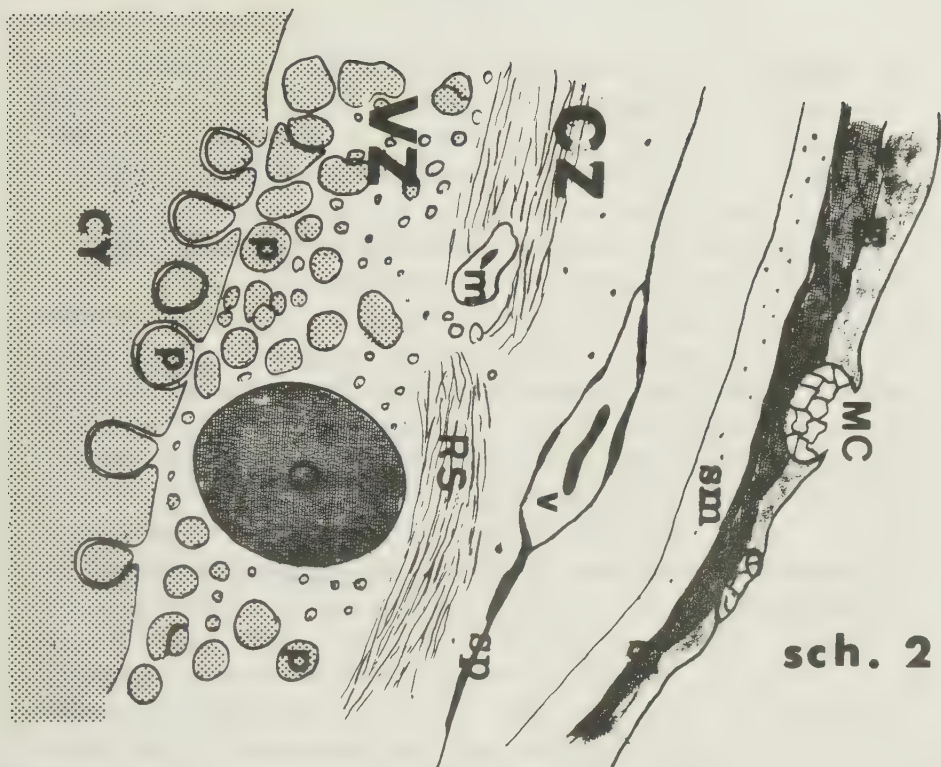
Représentation schématique de la couche syncytiale vitelline au milieu de la période de régression.

La zone cytoplasmique (CZ), dépourvue de plaquettes vitellines (P), voit son système réticulaire (RS) s'orienter perpendiculairement à la sphère vitelline.

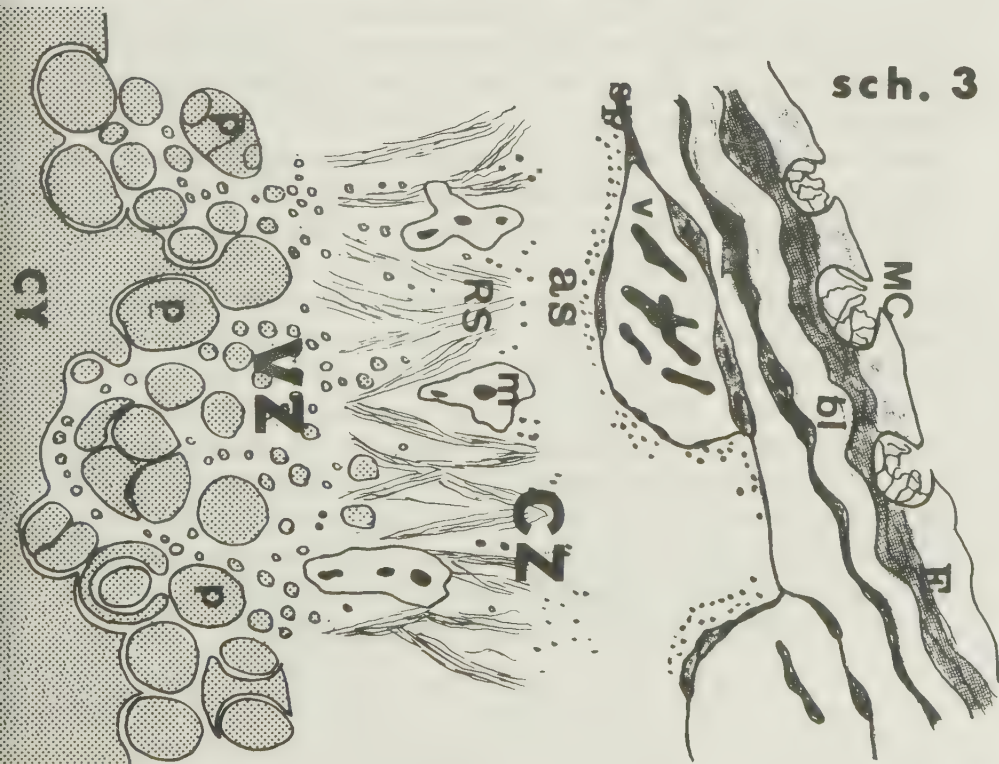
De fines granulations (diamètre inférieur à 1 micron) apparaissent sous la splanchnopleure (spl) et dans le système réticulaire.

Le découpage du vitellus coalescent (CY) en plaquettes vitellines s'intensifie dans la zone de vitellolyse (VZ).

MC : cellule à mucus, E : épiderme, bl : lame basale, so : somatopleure, v : vaisseau, as : aire de solubilisation, m : mérocyte ou noyau vitellin, O : gouttelette d'huile



sch. 2



sch. 3

faire barrière à la pénétration des plaquettes vitellines dans cette couche cytoplasmique. Ce système réticulaire est plus ou moins marqué, orienté, à l'éclosion, parallèlement à la sphère vitelline. A son niveau, on trouve des noyaux vitellins ou mérocytes. Ceux-ci ont très souvent un aspect multilobé, oblong. Ils sont pourvus de plusieurs gros nucléoles. Puis survient une région de faible affinité pour le colorant employé à l'exception de quelques granulations, mais de diamètre toujours inférieur à $1\ \mu$. La zone cytoplasmique se termine contre la splanchnopleure. Il faut aussi relever la présence de gouttes d'huile qui, d'une manière générale, occupent toute la CSV, mais que l'on peut rencontrer aussi légèrement enfoncées dans le vitellus coalescent.

2. EVOLUTION DE LA COUCHE SYNCYTIALE VITELLINE PENDANT LA RÉGRESSION

Durant cette période on assiste à l'augmentation de l'épaisseur de la CSV (de $20\ \mu$ environ à l'éclosion jusqu'à $120\ \mu$ à la fin de la régression) et à la diminution concomittante du volume du vitellus coalescent.

Pendant la première moitié de la régression, le système réticulaire acquiert une orientation perpendiculaire par rapport à la sphère vitelline.

Dans la deuxième moitié de la régression, la splanchnopleure subit, à certains endroits, une invagination dans le sac vitellin. L'espace périssplanchnique, situé entre la périphérie de la zone cytoplasmique et la splanchnopleure portant les vaisseaux, s'agrandit énormément, donnant une image caractéristique de mousse ou d'écume. Les gouttelettes d'huile tendent à se rassembler en un ou deux grands pools lipidiques. La disparition du vitellus coalescent, qui entraîne également celle de la zone de vitellolyse, marque la fin de la régression et le début de la période de starvation. Le sac vitellin se limite alors à la CSV qui contient les dernières grosses plaquettes vitellines et un ou deux grands pools lipidiques, ainsi que les noyaux vitellins devenus picnotiques et rassemblés en périphérie. La CSV ne consitue plus, par la suite,

qu'une mince bande qui s'appuie contre le tube digestif et le foie.

3. LA ZONE DE VITELLOLYSE

3.1. Formation des plaquettes vitellines

Nous avons dégagé deux modes de formation des plaquettes vitellines.

a) Formation par découpage sphérique

L'analyse ultrastructurale a permis d'observer que le vitellus coalescent apparaissait toujours homogène sous le faisceau électronique et qu'il était séparé de la zone de vitellolyse par une membrane. Cette membrane semble jouer un rôle important dans l'individualisation des plaquettes vitellines. Avant qu'une plaquette ne soit complètement entourée d'une membrane et libérée dans la zone de vitellolyse, on a pu constater qu'il doit d'abord se creuser, dans la masse coalescente, une sphère qui, progressivement, s'entoure d'une membrane.

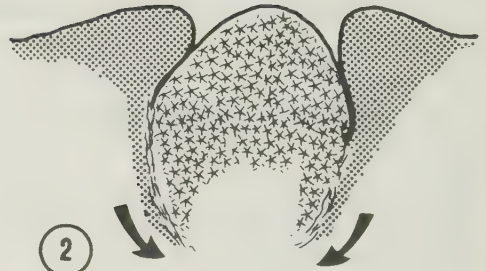
Tout d'abord la membrane du vitellus coalescent prend un aspect feutré en deux points (généralement séparés de 2 à 4 μ). En même temps et à ces deux niveaux, une légère invagination d'éléments fibrillaires a lieu dans la masse compacte (schéma 4a, 1). Puis ces structures fibrillaires continuent à progresser selon un cercle dans le vitellus (schéma 4a, 2). On parvient donc à la notion de plaquette vitelline sphérique dont le pôle supérieur est dirigé vers la zone de vitellolyse et le pôle profond enfoui dans le vitellus coalescent. En même temps que l'invagination des éléments fibrillaires gagnent le pôle profond de la plaquette, le pôle supérieur de cette dernière voit les éléments fibrillaires s'organiser en membranes respectivement du vitellus coalescent et de la plaquette. Dans un stade suivant, on reconnaît la plaquette bien individualisée, mais encore maintenue dans sa région équatoriale au vitellus coalescent par une fusion ou apposition des membranes plaquettaire et vitelline (schéma 4a, 3). Au pôle profond de la plaquette, l'espace entre les membranes devient très régulier (environ 150 à 200 Å ; schéma 4a, 4).

sch. 4a

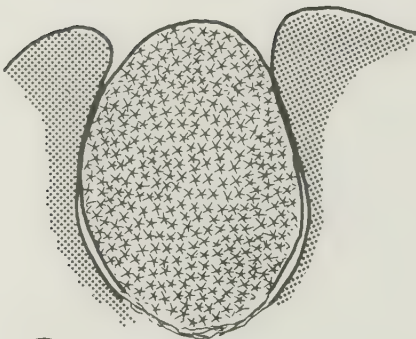


1

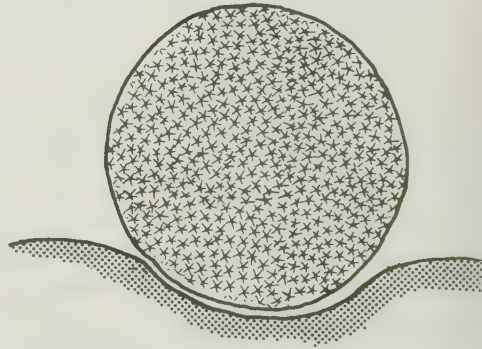
VC



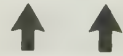
2



3



4



VC

Schéma 4a

Découpage sphérique d'une plaquette à partir du vitellus coalescent

Nous avons appelé cette succession d'événements conduisant à l'individualisation d'une plaquette, découpage sphérique du vitellus.

b) Formation par scission basale

Le découpage sphérique du vitellus tend à laisser des éléments vitellins qui font saillie dans la zone de vitellolyse entre les plaquettes bien individualisées (schéma 4b). Ces éléments vitellins ont alors la possibilité de s'isoler de la masse compacte en se détachant du vitellus coalescent. On assiste aussi, dans ce cas là, à la formation du système fibrillaire dans la région basale de la plaquette. Cette dernière modalité de formation d'une plaquette a été nommée scission basale.

Au cours de la régression, le découpage sphérique s'intensifie et donne naissance à des plaquettes de plus en plus grandes (jusqu'à 15μ) qui restent en étroit contact avec le vitellus coalescent (espace de 150 à $200 \text{ \AA}$). Ces grandes plaquettes peuvent à leur tour subir un découpage sphérique ou une scission basale, ce qui entraîne une individualisation des plaquettes vitellines sur plusieurs niveaux. Là aussi, bien que les plaquettes soient nettement distinctes, elles continuent à maintenir le contact l'une avec l'autre par un espace de 150 à $200 \text{ \AA}$ (schéma 5).

3.2. Diminution du volume des plaquettes vitellines

Etant donné que les plaquettes vitellines sont presque uniquement observées dans la zone de vitellolyse, nous avons supposé que leur dégradation intervenait surtout à ce niveau. Nous avons alors recherché si, au moyen de la microscopie électronique, nous pouvions mettre en évidence une ou plusieurs modalités de réduction du volume des plaquettes.

Les plaquettes de la zone de vitellolyse sont caractérisées par une membrane limitante et un contenu homogène sous le faisceau électronique.

a) Extrusion ou bourgeonnement (schéma 6, 1)

Ce phénomène est de loin celui que l'on observe le plus souvent au cours de la régression. Cette extrusion ou bourgeonnement semble se réaliser à nou-

Schéma 4b

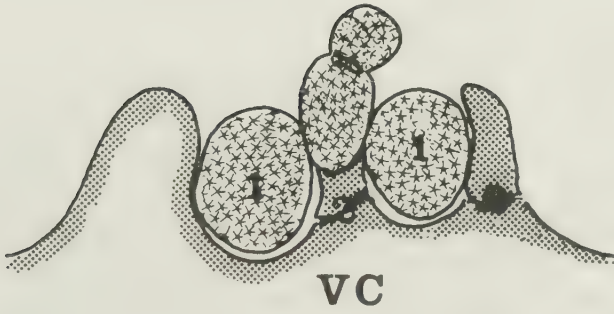
Formation des plaquettes vitellines à partir du vitellus coalescent par scission basale (2).

(1) représente des plaquettes formées par découpage sphérique

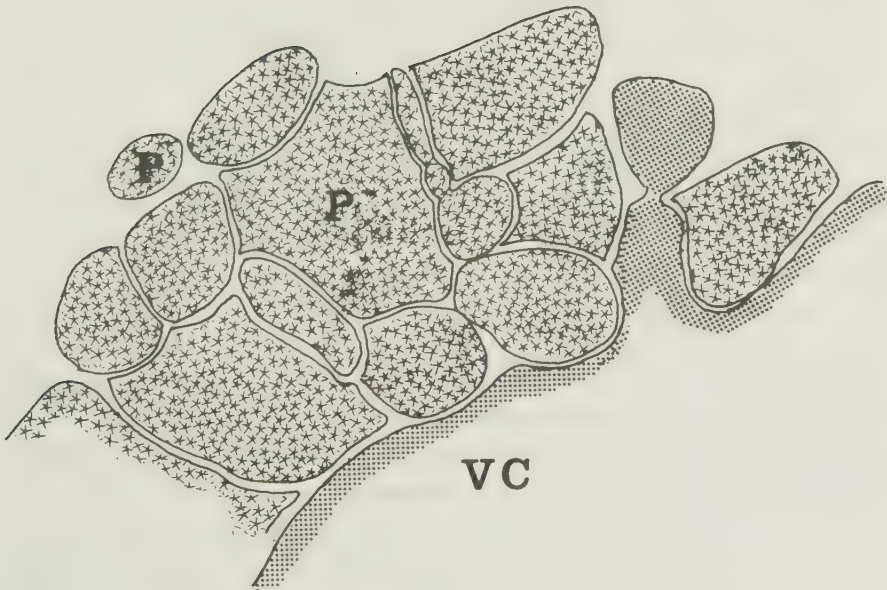
Schéma 5

Formation de plaquettes vitellines sur plusieurs niveaux au milieu de la période de régression. Les plaquettes semblent maintenir un certain contact entre elles grâce à un " gap " de 150 à 200 Å de largeur

sch. 4b



sch. 5



veau grâce au système fibrillaire. Il remplace la membrane d'une plaquette sur une petite longueur de celle-ci. Le matériel vitellin de la plaquette tend alors à s'écouler par cet endroit en repoussant le système fibrillaire devant lui et en créant ainsi une hernie. Ce bourgeon, ainsi formé, s'isole de la plaquette et il se forme une membrane sur tout le pourtour de la nouvelle plaquette ainsi qu'au lieu d'extrusion sur l'ancienne plaquette.

b) Eclatement (schéma 6, 2)

On observe des plaquettes qui ont perdu leur membrane limitante et dont le contenu présente un aspect " étoilé ". On a l'impression d'un déversement direct du matériel vitellin dans le hyaloplasme.

c) Scission bipartite (schéma 6, 3)

Certaines plaquettes semblent se scinder en deux parties égales avec maintien, au lieu de découpage, de " ponts vitellins ".

d) Compression (schéma 6, 4)

Il est possible que la zone de vitellolyse soit le siège de courant cytoplasmique qui serait susceptible de comprimer, ou d'étirer, une plaquette située entre deux autres et de procéder ainsi à sa scission.

e) Cas particuliers d'extrusion: β -glycogène et vésicules lisses

β -glycogène (schéma 6, 5)

A l'éclosion, on observe souvent, semblant quitter une plaquette, de fines granulations d'un diamètre de 250 Å et rappelant le β -glycogène selon Drochmans (1962). Cette impression est confirmée par la réaction positive de ces structures au test de Thiéry (1967). Cette libération ou cette formation de particules est à nouveau observée uniquement dans les régions d'une plaquette dont la membrane limitante a disparu ou, plus exactement, s'est transformée en système fibrillaire. A certains endroits, ces granules sont si nombreux qu'ils envahissent complètement le hyaloplasme de la zone de vitellolyse.

Au cours de la régression, la production de β -glycogène diminuera et on ne retrouvera plus que quelques granules autour

sch. 6

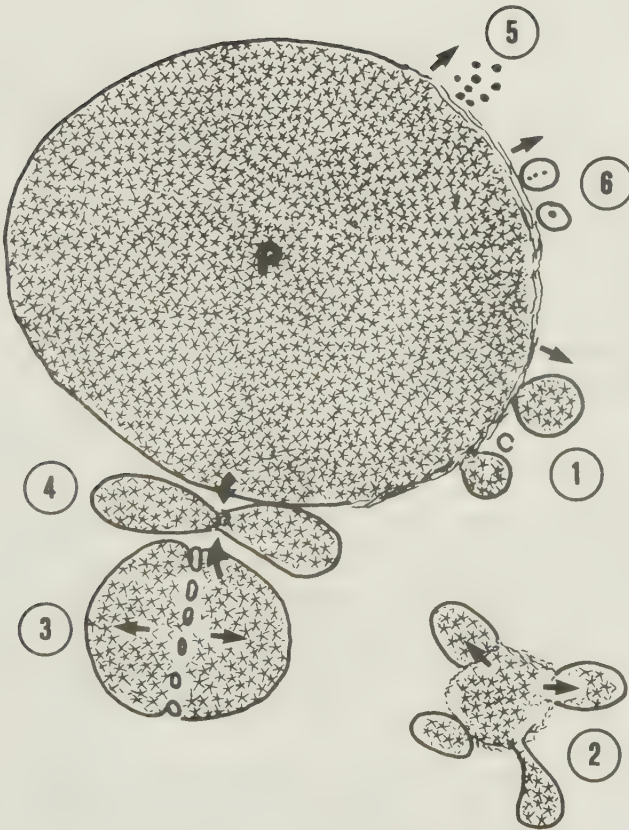


Schéma 6

Différentes possibilités de diminution de volume d'une plaquette vitelline de la zone de vitellolyse.

1. Extrusion ou bourgeonnement
2. Eclatement
3. Scission bipartite
4. Compression
5. Extrusion de β -glycogène
6. Abouchement de vésicules lisses

des plaquettes.

Vésicules lisses (schéma 6, 6)

Des vésicules lisses, peu nombreuses à l'éclosion, semblent se former à partir du système fibrillaire des plaquettes vitellines. Ces vésicules, en étroit contact avec les plaquettes, contiennent quelques granules osmiophiles de 200 à 250 Å de diamètre. Ces grains semblent constitués d'une partie lipidique importante comme le révèlent les trous observés après une digestion à la lipase.

Durant la deuxième période de la régression, on s'aperçoit que, dans les vésicules, le diamètre des grains augmente (500 à 1000 Å de diamètre). Par place, ces granules ne sont même plus entourés d'une membrane et remplissent complètement le hyaloplasme. Leur nature chimique semble changer, puisque l'on n'observe plus qu'une digestion partielle soit après la lipase ou la pronase-lipase.

3.3. Phosphatases alcalines et acides

a) Phosphatases alcalines

La cytochimie ultrastructurale permet également de rapporter une observation intéressante liée au système fibrillaire. Lors de la transformation partielle de la membrane de la plaquette en système fibrillaire, il apparaît, à cet endroit, une réaction positive aux phosphatases alcalines (Hugon et Borgers, 1966). Des coupes témoins, incubées sans β -glycérophosphate, ne montrent jamais de précipité dans cette zone. D'autre part l'adjonction d'EDTA au milieu d'incubation complet présente aussi un résultat négatif.

b) Phosphatases acides (ACpase)

On trouve également dans la zone de vitellolyse des structures présentant des images d'enroulements membranaires plus ou moins importants.

Des coupes, traitées par la méthode de Barka et Anderson (1962), révèlent sur les structures un précipité de phosphate de plomb. A la fois l'observation morphologique et le résultat cytochimique nous ont amené à appeler ces organites corps résiduels et à les considérer comme les derniers restes de la dégradation des plaquettes vitellines.

Nous n'avons jamais observé de contact entre ces corps résiduels et les plaquettes vitellines de la zone de vitellolyse.

4. LA ZONE CYTOPLASMIQUE

4.1. Description générale de la zone cytoplasmique (schéma 7)

La microscopie électronique a mis en évidence une disposition intéressante des organites dans la zone cytoplasmique.

Réticulum Endoplasmique Granulaire (REG)

On a observé, sur semi-fines, que la zone cytoplasmique débutait, basalement, par un système réticulaire plus ou moins prononcé. En microscopie électronique, on peut voir que ce système est composé de citernes allongées et aplaties, bordées de grains osmiophiles. Ces citernes s'organisent en travées qui, au début de la régression, sont orientées parallèlement à la sphère vitelline. Ces travées ne se disposent pas d'une manière continue autour de cette sphère, mais présentent souvent des zones d'interruption.

Il semble ne faire aucun doute que ce système représente le REG auquel sont attachés les ribosomes.

Noyaux vitellins

On rencontre ces noyaux soit entre les dernières plaquettes de la zone de vitellolyse et les travées du REG, soit dans les zones d'interruption de ces dernières. De forme toujours tourmentée, ils possèdent de 1 à 7 nucléoles et sont toujours entourés de nombreuses mitochondries.

Golgi

L'appareil de Golgi, toujours proche des travées du REG, est caractérisé par le fait que, pendant la première moitié de la régression, ses vésicules de concentration et de sécrétion (nomenclature de Vernier, 1975) contiennent des produits granulaires, très osmiophiles, de 300 à 350 Å de diamètre.

On rencontre l'appareil de Golgi à deux endroits:

a) dans les zones d'interruption des travées du REG.

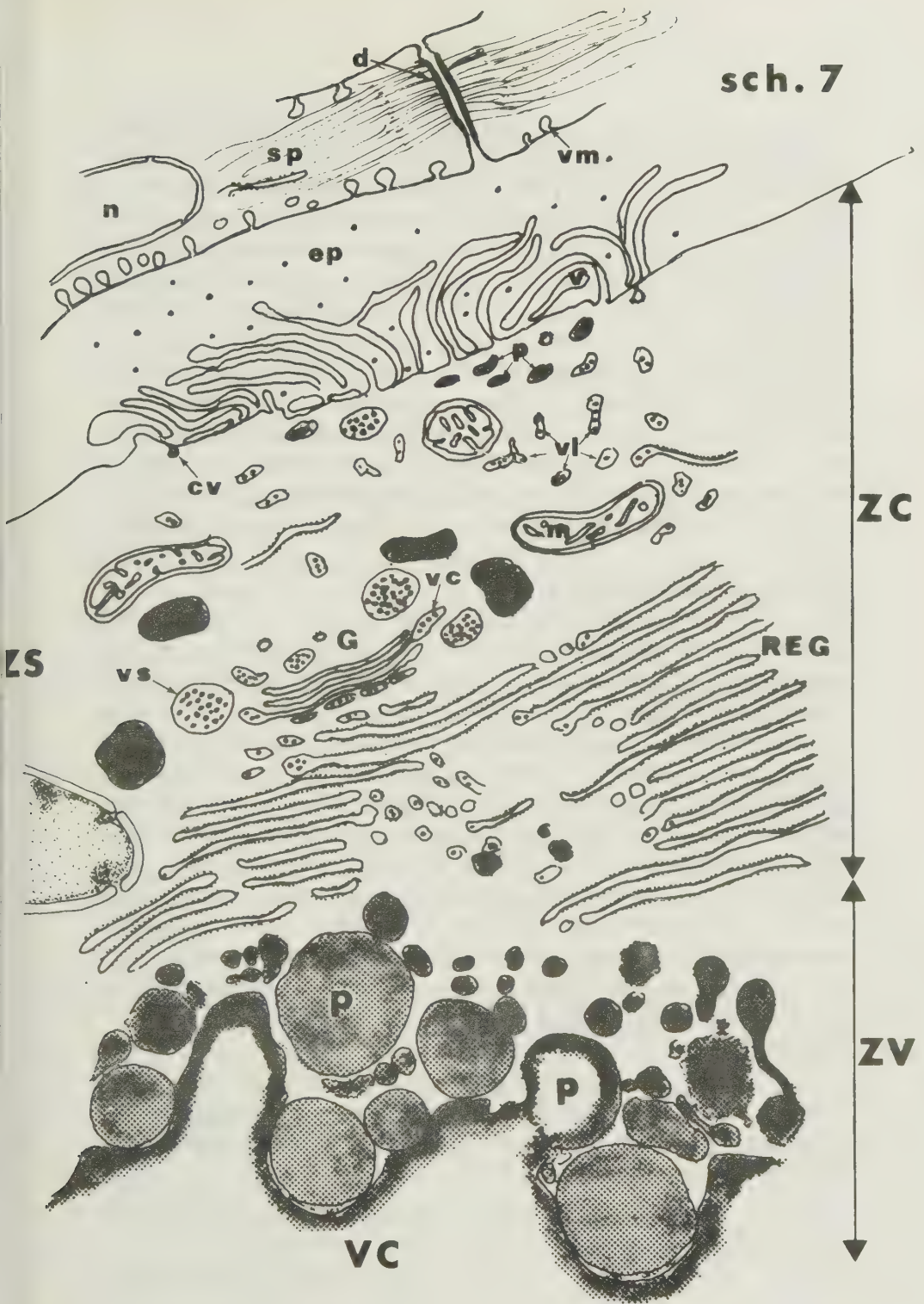
Dans cette position, l'appareil de Golgi ne montre pas une

Schéma 7

Schéma de l'organisation de la couche syncytiale vitelline chez *Salmo fario trutta* au moment de l'éclosion.

Légende :	d	:	desmosome
	sp	:	splanchnopleure
	n	:	noyau
	vm	:	microvésicule
	ep	:	espace périsplanchnique
	cv	:	coated-vesicle
	p	:	plaquette
	vl	:	vésicule lisse
	m	:	mitochondrie
	vc	:	vésicule de concentration
	vs	:	vésicule de sécrétion
	G	:	Golgi
	ZC	:	zone cytoplasmique
	ZV	:	zone de vitellolyse
	VC	:	vitellus coalescent
	REG	:	réticulum endoplasmique granulaire
	ZS	:	aire de solubilisation

sch. 7



polarité préférentielle : ses faces de formation et de maturation (nomenclature de Mollenhauer et Whaley, 1963) sont dirigées aussi bien du côté des plaquettes vitellines les plus superficielles que vers la partie supérieure de la zone cytoplasmique. Dans le cas d'une orientation des produits de sécrétion du Golgi vers les plaquettes vitellines, on peut observer fréquemment un contact entre ces vésicules de sécrétion et les plaquettes pénétrant dans la zone cytoplasmique;

b) dans l'aire de faible affinité pour le colorant utilisé en semi-fines juste après les travées du REG.

Dans cette position, l'appareil de Golgi montre toujours la même polarité : sa face de formation est dirigée vers les vésicules agranulaires du réticulum endoplasmique, tandis que sa face de maturation s'ouvre du côté de la circulation vitelline.

Aire de solubilisation

Cette aire varie d'épaisseur selon le développement des travées du REG (généralement de 3 à 6 μ). Elle est caractérisée, à l'éclosion, par la présence de citernes de réticulum endoplasmique lisse aussi bien que par des vésicules lisses contenant un ou plusieurs granules osmiophiles de 300 à 350 Å de diamètre. Occasionnellement quelques citernes de REG peuvent être observées. C'est dans cette région que les mitochondries sont les plus nombreuses, spécialement à l'éclosion, lorsque le hyaloplasme adjacent est riche en β -glycogène. Ces mitochondries présentent des formes variées : en haltère, en anneau, sphérique ou ellipsoïde. Elles possèdent généralement une matrice de faible densité électronique et des crêtes bien développées. L'aire de solubilisation est la seule portion de la CSV à contenir des microtubules.

Villosités

L'aire de solubilisation se termine par des villosités (diamètre : 500 Å) qui jouxtent la splanchnopleure. Le corps de ces villosités ne contient jamais d'organites ou d'inclusions quelconques.

4.2. Evolution de la zone cytoplasmique pendant la régression

Au cours de la première moitié de la régression, les travées du REG acquièrent une orientation perpendiculaire à la sphère vitelline. L'appareil de Golgi ne se rencontre plus entre les travées du REG. Il est localisé à l'extrémité la plus superficielle de ces dernières, au début de l'aire de solubilisation. Les granules à l'intérieur de ses vésicules de sécrétion augmentent de diamètre (450 à 600 Å), puis finalement disparaissent. Il se développe alors en avant de sa face de formation un réseau de canalicules et de vésicules complexes faisant songer au GERL-complex (Novikoff et al., 1971, 1972).

Tout au cours de la régression, on note un allongement progressif des villosités.

En période de starvation, lorsque le sac vitellin est constitué uniquement de la partie cytoplasmique, on ne retrouve plus l'organisation décrite REG → Golgi → aire de solubilisation → villosités. Le REG ne s'organise plus en travées, mais présente uniquement des citernes de longueur variable, réparties dans toute la CSV. Le Golgi, sans produit électroniquement dense dans ses vésicules de sécrétion, mais avec de nombreuses coated-vesicles et corps denses dans sa face de formation, voisinent les dernières grandes plaquettes vitellines de contenu très hétérogène. L'aire de solubilisation a complètement disparu. Les noyaux vitellins s'accumulent en périphérie de la CSV et présentent un aspect picnotique.

4.3. Plaquettes vitellines dans la zone cytoplasmique

L'examen de la couche cytoplasmique permet de constater, qu'elle aussi, à l'instar de la zone de vitellolyse mais à une échelle beaucoup moins importante, est engagée dans la dégradation des plaquettes vitellines.

Dans cette partie cytoplasmique, on rencontre deux populations de plaquettes vitellines.

a) Plaquettes vitellines de 1 à 6 μ de diamètre

De par ces dimensions, cette population de plaquettes a été qualifiée de grande.

Ces plaquettes, peu nombreuses à l'éclosion, sont toujours entourées d'une membrane et sont caractérisées par le fait qu'elles ont un contenu hétérogène sous le faisceau électronique : aspect de " finger-print ", de " coup de gomme " révélant un aspect fibrillaire; parfois elles présentent une légère vacuolisation et des structures électroniquement denses. On trouve ces grandes plaquettes uniquement dans la partie basale de la zone cytoplasmique, généralement dans les zones d'interruption des travées du REG, près ou en contact avec les produits de sécrétion de l'appareil de Golgi. Puis, au cours de la régression, les plaquettes qui s'infiltrèrent dans la zone cytoplasmique deviennent plus nombreuses. Leur contenu est de plus en plus hétérogène et leur résolution en unités plus petites est bien évidente. L'hétérogénéité de ces plaquettes se manifeste par la disposition d'un système de membranes concentriques sur leur pourtour. Celui-ci, généralement, se dispose en trois ou quatre couches. Parfois, on note un envahissement complet de la plaquette. Ces structures membranaires semblent conduire, dans une étape suivante, à des bandes lamellaires concentriques similaires à ce que Karasaki (1963) décrivait chez l'embryon de Triton. A l'intérieur de ces structures, on peut rencontrer des plaquettes homogènes de plus petites dimensions, des vacuoles électroniquement vides, des corps denses, du β -glycogène, des mitochondries. Toutefois, comme au début de la régression, on ne retrouve jamais ces grandes plaquettes dans l'aire de solubilisation.

b) Plaquettes vitellines de diamètre inférieur à $1\ \mu$

Cette seconde population de plaquettes a été dénommée petite (généralement de 0,2 à 0,5 μ de diamètre). A l'éclosion et pendant la première moitié de la régression, on les observe en premier lieu entre les travées du REG ou dans les zones d'interruption de ces dernières, ensuite près de l'appareil du Golgi de l'aire de solubilisation et sous les villosités. Elles sont tout à fait homogènes électroniquement, délimitées par une membrane et sphériques de forme. Puis au cours de la régression, ces petites plaquettes augmentent en nombre. On les rencontre toujours entre les travées du REG où elles effectuent un certain nombre de contacts surtout avec les

vésicules de transition qui proviennent du REG (nomenclature de Favard, 1969; Thiéry, 1969) ou avec les boulevards périphériques de ce dernier (nomenclature de Morré et al., 1971; Ovtracht et Thiéry, 1972). Puis au début de l'aire de solubilisation, ces plaquettes commencent à devenir hétérogènes. Elles atteignent des dimensions légèrement plus importantes ($0,5$ à $0,7 \mu$) qu'au niveau des travées du REG. Dans cette région, les plaquettes vont entrer en contact avec les vésicules de sécrétion du Golgi, les coated-vesicles ou les corps denses. On a l'impression que ces plaquettes subissent, à ce niveau, une diminution de volume, impression encore renforcée par le fait que le Golgi présente une forte activité phosphatasique acide. Puis on retrouve ces plaquettes sous les villosités où elles semblent s'accumuler. Elles sont d'un diamètre plus petit qu'au niveau du Golgi (de $0,1$ à $0,3 \mu$) et prennent volontiers un aspect ovoïde, oblong ou parfois même en haltère.

4.4. Formation d'éléments nouveaux

Si la zone cytoplasmique possède une caractéristique de zone sécrétoire, on doit pouvoir trouver, à son intérieur, des inclusions autres que les plaquettes vitellines qui tendent à supporter cette vue.

LTBD (lipoprotéines à très basse densité ou VLDL, very low density lipoproteins, des auteurs anglo-saxons).

Dès l'éclosion, les citernes du REG contiennent quelques fins granules de 150 à $200 \text{ \AA}$ de diamètre, plus ou moins osmiophiles. Très épars dans les citernes granulaires, ces granules deviennent plus fréquents dans les parties agranulaires et augmentent de diamètre (300 à $350 \text{ \AA}$) ainsi que d'osmiophilie. On retrouve ces granules dans les vésicules de transition (nomenclature de Vernier, 1975), vésicules qui semblent fusionner pour former les sacs les plus externes de la face de formation du Golgi. Les granules sont alors entraînés dans les vésicules de sécrétion où ils sont étroitement disposés, mais toujours individualisés. Ces vésicules de sécrétion peuvent parfois atteindre de grand diamètre (plus grand qu' 1μ). Il n'est pas rare de voir fusionner une vésicule de sécrétion avec une coated-vesicle, issue du GERL complexe. Dans la région de juxtaposition Golgi-REG, on observe une autre spécialisation : parfois une citerne du REG, dans son extrémité, devient agra-

nulaire, s'élargit et se remplit de granules osmiophiles. Cette partie agranulaire peut, de temps en temps, fusionner avec des vésicules de concentration ou de sécrétion, ou avec des inclusions de type petites plaquettes vitellines. Ces structures, appelées boulevards périphériques, tendent donc à relier directement le REG aux produits de sécrétion du Golgi ou à d'autres inclusions. Vers le milieu de la régression, les granules à l'intérieur des vésicules de sécrétion augmentent de diamètre (400 à 600 Å), puis disparaissent.

Corps cristallins

Pendant la deuxième moitié de la régression, il apparaît, au début de l'aire de solubilisation, une série d'inclusions de 0,2 à 1 μ de diamètre, de forme sphérique ou parfois cubique, constituées d'un matériel moyennement dense aux électrons et d'une membrane limitante. Le contenu de ces inclusions révèle soit une structure cristalline périodique, soit une structure homogène. Pour les inclusions sphériques, il subsiste, entre la membrane limitante et le contenu, un léger espace peu dense aux électrons et d'environ 200 Å d'épaisseur. Cette caractéristique est typique de cette structure. Il est d'autre part possible que ces inclusions représentent des dilatations des citernes du REG. A certains endroits, le pourtour extérieur de la membrane limitante est tapissé de ribosomes. L'action de la pronase sur ces inclusions révèle une digestion partielle de leur contenu.

Structures pseudovésiculaires

Cette structure fait son apparition juste après l'éclosion, et persiste pendant toute la période de la régression. Toutefois son observation est peu fréquente. Sa disposition dans la couche cytoplasmique est exactement la même que celle des corps cristallins. Cette structure apparaît toujours à la pointe d'une ou plusieurs citernes de REG. Elle présente une analogie ultrastructurale frappante avec des structures rencontrées chez *Salmo gairdneri* : d'une part avec les like-lipochondria (voir paragraphe suivant), d'autre part avec les derniers restes de plaquettes vitellines pendant la starvation.

Lipochondries chez *Salmo gairdneri*

Dans une espèce voisine, *Salmo gairdneri*, il a été

mentionné des inclusions particulières auxquelles on a attribué le nom de like-lipochondria (Walzer et Schönenberger, 1972). Ces corps diffèrent des plaquettes vitellines par leur forme très tourmentée et découpée, par leur dimension variable pouvant parfois atteindre jusqu'à 7μ de longueur. Ils possèdent un contenu non-homogène aux électrons où l'on rencontre beaucoup de figures d'empreintes digitales ou de pseudovésicules. On observe ces structures tout de suite après le REG, au début de l'aire de solubilisation. Certaines régions de la couche syncytiale vitelline possèdent tellement de ces inclusions que sur coupes semi-fines il n'est guère pensable de subdiviser cette couche en zone de vitellolyse et zone cytoplasmique. Toutefois, l'examen en microscopie électronique confirme que la subdivision faite pour *Salmo fario* est aussi valable pour *Salmo gairdneri*. Ce même examen démontre que les lipochondries sont absentes de la zone de vitellolyse. Il indique aussi que les citernes du REG effectuent des contacts avec les petites plaquettes vitellines, petites plaquettes vitellines qui semblent alors progressivement se transformer en lipochondries lorsqu'elles parviennent au début de l'aire de solubilisation. Dans cette aire, les lipochondries vont entrer en contact avec les vésicules de sécrétion, les coated-vesicles et les corps denses de l'appareil de Golgi. On ne retrouve jamais ces lipochondries dans la fin de l'aire de solubilisation et sous les villosités. La zone cytoplasmique de *Salmo gairdneri* est dépourvue de corps cristallins ou de structures pseudovésiculaires tels qu'on peut les rencontrer chez *Salmo fario*.

4.5. Activités enzymatiques de la zone cytoplasmique β -glycerophosphatase acide (ACpase)

La détection cytochimique de cette enzyme a montré qu'elle était surtout liée à l'appareil de Golgi. Au début de la régression, les vésicules de concentration et de sécrétion de l'appareil de Golgi réagissent positivement ainsi que le GERL-complex (notamment certains tubules et coated-vesicles). Il est parfois possible d'observer une vésicule de sécrétion en étroit contact avec les plaquettes les plus superficielles de la zone de vitellolyse. Lorsque la régression se poursuit,

le Golgi continue à être marqué ainsi qu'un certain nombre de petites plaquettes et de vacuoles dans son voisinage. Cette activité positive s'étend même jusqu'au niveau des villosités. Les grandes plaquettes, qui pénètrent dans la zone cytoplasmique sont souvent marquées d'un précipité de sels de plomb, pour autant qu'elles présentent un aspect hétérogène sous le faisceau électronique.

Thiamine pyrophosphatase (TPPase)

Ce sont les saccules les plus internes de la face de maturation, les vésicules de concentration et de sécrétion de l'appareil de Golgi qui sont marqués. Parfois, une petite plaquette, au voisinage du Golgi, présente une réaction positive.

L'activité de la TPPase dans l'appareil de Golgi semble diminuer lorsque les produits de sécrétion augmentent de diamètre. Cette activité finit par disparaître en fin de régression.

Peroxidase

Il existe autour des noyaux vitellins des organites, facilement reconnaissables de par cette position, de dimensions restreintes (0,2 à 0,3 μ de diamètre), de contour irrégulier et de contenu peu contrasté. Ces organites réagissent positivement après incubation dans le milieu décrit par Beard et Novikoff (1969) et pour autant que la préfixation ait eu lieu avec de la paraformaldéhyde. La glutaraldéhyde provoque une inhibition complète de l'activité enzymatique que ce soit après emploi du milieu de Beard et Novikoff (1969) ou celui décrit par Novikoff et al. (1973). Après fixation à la paraformaldéhyde, l'aminotriazole, dans le milieu d'incubation, provoque l'inhibition de ces structures.

Ces corps sont aussi observés entre les travées du REG.

Glucose-6-phosphate déshydrogénase

La méthode de Meijer (1972) ne permet la détection de cette activité qu'au niveau de coupes réalisées au cryostat et examinées en microscopie optique.

La couche syncytiale vitelline réagit positivement à la détection de cette enzyme pendant toute la régression.

5. DECHARGE DES PRODUITS ISSUS DU VITELLUS DANS LA CIRCULATION VITELLINE

Que les produits vitellins soient issus directement de la zone de vitellolyse ou qu'ils aient été transformés dans la zone cytoplasmique, ces produits doivent, dans une étape suivante, quitter le sac vitellin pour gagner l'embryon. Pour se faire, ils doivent franchir la membrane plasmatique qui borde les villosités. Cette première étape permet aux produits issus du vitellus de se retrouver dans l'espace périssplanchnique. De là, et dans une seconde étape, ces produits devront pénétrer dans le lumen des capillaires vitellins.

5.1. Première étape : franchissement de la membrane plasmatique des villosités

Dans l'aire de solubilisation et sous les villosités de la CSV, on observe deux sortes d'inclusions qui franchiront la barrière plasmatique des villosités.

- a) Des inclusions de type plaquettes vitellines (0,1 à 0,3 μ de diamètre).
- b) Des inclusions délimitées par une membrane et contenant des granulations denses aux électrons. A la fois le diamètre de ces inclusions et de ces granulations augmentera pendant la régression (respectivement de 0,5 à 1 μ pour les premières et de 350 à 1000 Å pour les dernières). Nous avons appelé ce type d'inclusions vacuoles granulaires.

Dans ces deux cas, les inclusions sont entourées d'une membrane. Pour franchir la membrane plasmatique des villosités, deux modalités ont été observées :

- fusion de la membrane de ces deux types d'inclusions avec la membrane plasmatique;
- émission, à la base des villosités, de coated-vesicles, qui sont susceptibles de s'enfoncer dans l'aire de solubilisation en développant derrière elles une espèce de canalicule (diamètre: 250 à 300 Å). Puis, lorsque la coated-vesicle rencontre une inclusion de type plaquette vitelline ou

vacuole granulaire, on peut observer la fusion de leurs membranes.

Grâce à ces deux modalités, les produits issus du vitellus vont se retrouver dans l'espace périsplanchnique. Là, on observe ces produits sous deux formes :

L'une granulaire, qui suggère que ce matériel est le même que celui observé dans les vacuoles granulaires (même diamètre des granulations, même opacité électronique).

L'autre matricielle; l'espace entre les granules acquiert une opacité plus grande aux électrons au cours de la régression en même temps que les inclusions du type plaquettes vitellines augmentent sous les villosités dans l'aire de solubilisation. Au cours de la régression, ce phénomène de passage s'amplifie. Il s'accompagne d'un allongement progressif des villosités et du développement concomittant de l'espace périsplanchnique.

5.2. Deuxième étape : franchissement de l'endothélium profond des capillaires

L'espace périsplanchnique est séparé du lumen des vaisseaux par l'endothélium profond des capillaires (cf. schémas 2 et 3). L'étude de cet endothélium nous amène, dans un premier temps, à discuter de la couche qui lui donne naissance : la splanchnopleure.

La splanchnopleure, ainsi que la somatopleure, toutes deux issues des lames latérales, sont formées de cellules mésodermiques qui ont essaimé lors des mouvements de convergence (Ballard, 1973 a, b et c). C'est au stade 20 de Ballard (1973 a) qu'apparaissent, çà et là, les premiers îlots sanguins ainsi que la veine vitelline, éléments issus du mésoderme splanchnique.

Pendant la phase de régression, nos observations montrent clairement que la paroi des vaisseaux vitellins est constituée d'un endothélium vasculaire et d'une couche de cellules splanchniques.

Pour les vaisseaux importants (veine vitelline et veines adjacentes), les couches endothéliale et splanchnique sont disposées sous forme de deux feuillets continus de cellules, séparés par un étroit espace extracellulaire. Par contre, les

petits capillaires ne présentent pas la couche de cellules splanchniques du côté des villosités, mais qu'un endothélium vasculaire, alors qu'extérieurement, du côté de la somatopleure, ils possèdent à la fois endothélium et cellules splanchniques.

L'examen ultrastructural de cet endothélium des petits capillaires permet de voir qu'il est constitué de cellules extrêmement aplaties où les organites sont peu nombreux. Ces cellules émettent de longs prolongements que l'on confond facilement avec les villosités. Ces prolongements révèlent des spécialisations propres aux cellules endothéliales. A certains endroits, ils présentent des fenestrations, tandis qu'à d'autres la discontinuité est évidente. Les contacts entre les cellules de cet endothélium se réalisent surtout au niveau des prolongements cellulaires. Lorsque deux prolongements, appartenant à deux cellules différentes, se rencontrent, on observe le glissement de l'un des prolongements sur l'autre. On constate alors, au niveau de ce glissement, deux à trois rapprochements ou contacts de membranes, mais toujours séparés par un "gap" d'environ 40 Å.

Les cellules splanchniques contiennent de nombreuses cisternes de réticulum endoplasmique granuleux, ainsi que de nombreuses microvésicules. Son appareil de Golgi réagit positivement après incubation à la thiamine pyrophosphatase. Une autre caractéristique de ces cellules est la présence de nombreux microfilaments dont le nombre augmente pendant la régression. Les cellules de la splanchnopleure sont maintenues entre elles centralement par des contacts du type macula adherens (Karnovsky, 1967) alors que, dans les parties supérieures et inférieures du contact, les deux feuilletts les plus externes de chaque membrane tendent à se joindre. Toutefois, il subsiste toujours un "gap" d'environ 40 Å.

L'injection de peroxydase de raifort dans le sac vitellin nous a permis de constater qu'après 15 minutes, le corps des microvillosités est complètement noir, ainsi que les jonctions intercellulaires des cellules splanchniques et la surface des membranes de l'endothélium vasculaire. Après 35 minutes, les mêmes images prédominent, mais on peut détecter en plus

un dépôt de "noir d'osmium" (Seligman et al., 1968) dans les vésicules de micropinocytoses des cellules splanchniques. Les mêmes séquences d'événements sont aussi observées si la peroxydase de raifort est appliquée dans le milieu extérieur et à un alevin dont la vésicule vitelline a été débarassée de son épiderme.

Le marquage de l'espace extracellulaire par le nitrate de lanthane (Revel et Karnovsky, 1967) ou l'application de rouge de ruthénium (Luft, 1971 a et b) confirment également la perméabilité splanchnique.

DISCUSSION

L'étude de la CSV, pendant la régression, permet de subdiviser cette couche en deux parties : la zone de vitellolyse et la zone cytoplasmique. Ces deux délimitations sont tout à fait virtuelles et reposent sur la présence (zone de vitellolyse) ou l'absence (zone cytoplasmique) de plaquettes vitellines. Toutefois cette subdivision ne peut pas être établie aussi clairement dans les stades de la morphogenèse et de l'organogenèse parce que, très souvent, on rencontre des plaquettes dans toute la CSV. De la présente étude, il ressort que la CSV est engagée, par sa zone de vitellolyse, tout d'abord dans la formation de plaquettes vitellines à partir du vitellus coalescent, puis dans la dégradation de ces dernières. Dans les deux cas, un changement morphologique s'opère uniquement lorsque la membrane limitante, soit du vitellus coalescent, soit d'une plaquette vitelline, se transforme dans ce qu'on a appelé système fibrillaire.

Zone de vitellolyse

L'invagination d'éléments fibrillaires dans le vitellus coalescent conduit à l'individualisation d'une plaquette vitelline. Nous interprétons ce processus comme la première étape de la vitellolyse.

Il est très difficile de fournir une explication sur les mécanismes qui conduisent à la formation d'une plaquette. Si, chez le Poulet, Lambson (1970) a montré que les granules vitellins électroniquement denses étaient phagocytés par les cellules endodermiques grâce à un système compliqué de coated-vesicles et de canalicules apicaux, on constate que ces différents processus ne se réalisent pas chez le Poisson. Ceci est peut-être dû au fait que la CSV est acellulaire et qu'elle représente un stade moins évolué que les cellules endodermiques du Poulet.

Etant donné que ni les phosphatases acides, ni les phosphatases alcalines ont été démontrées au niveau du découpage

des plaquettes ou de la scission basale, on est tenté d'expliquer ces deux phénomènes comme l'expression d'un remaniement du matériel vitellin.

La dégradation des plaquettes dans la zone de vitellolyse peut être considérée comme la seconde étape de la vitellolyse. Si l'on possède des données ultrastructurales concernant les aspects morphologiques de la résorption des plaquettes vitellines chez les Amphibiens (Karasaki, 1963; Jurand et Selman, 1964) et chez les Oiseaux (Williams, 1967; Lambson, 1970), on ne peut guère les comparer avec celles obtenues chez les Poissons (Vernier et Sire, 1977 a et b). Chez le Poisson, on ne trouve pas de plaquettes avec un corps cristallin et une couche superficielle granulaire ou fibrillaire (Karasaki, 1963; Jurand et Selman, 1964), ni de vacuoles contenant des " granules vitellins " (Lambson, 1970). Vernier et Sire (1977 a et b) observent, dans le vitellus profond, des plaquettes vitellines constituées d'une substance amorphe et entourées d'une membrane. Puis, plus superficiellement, les plaquettes renferment du matériel membranaire, des particules de β -glycogène et finalement elles acquièrent l'aspect de vacuoles autophagiques ou de corps résiduels.

Notre propre description diffère légèrement puisque les plaquettes de la zone de vitellolyse, après l'éclosion, sont de structure homogène. Seules les plaquettes qui pénètrent dans la zone cytoplasmique acquièrent un aspect hétérogène et polymorphique. Par contre on ne retrouve plus, dans la zone de vitellolyse, des plaquettes ayant l'aspect membranaire ou de "yolk fatty center" (Ward, 1962) envisagées par Vernier et Sire (1977 b) comme étape intermédiaire dans la dégradation des plaquettes vitellines. On peut, sans doute, expliquer cette différence en rappelant que les études de Vernier et Sire (1977 a et b) portent surtout sur les stades de l'organogenèse, alors que le présent travail relate des résultats obtenus après l'éclosion, à un moment où l'embryon entre en pleine phase de croissance. Philips et al. (1958), puis Ando (1965) ont démontré que la principale charge du vitellus, c'est-à-dire les protéines, sont activement métabolisées

pendant la phase de régression du vitellus. Faut-il alors supposer qu'une utilisation plus rapide des réserves, surtout du pool protéique, fasse éviter la transformation ou le passage en vitellus du type "yolk fatty center".

La démonstration de la phosphatase acide s'est révélée négative au niveau des plaquettes vitellines de la zone de vitellolyse, rejoignant ainsi les résultats de Vernier et Sire (1977 b) pour les plaquettes du vitellus profond. Seuls les corps résiduels, considérés comme les derniers restes de la dégradation d'une plaquette, réagissent positivement. La fusion entre des corps résiduels et des plaquettes vitellines n'a pas été observée.

La détection de la phosphatase alcaline au niveau du système fibrillaire, et uniquement à cet endroit, est intéressante. En effet, il est généralement admis que la solubilisation du vitellus doit passer par une étape de déphosphorylation. Pour le vitellus des Poissons, Amirante (1972) suggérait la solubilisation de la lipovitelline et de la phosvitine grâce à l'action conjuguée du calcium et d'une phosphoprotéine phosphatase. On pourrait donc envisager que le calcium, en se liant aux phosphoprotéines (Williams, 1967), participe à la libération du phosphate et que celui-ci soit transféré dans le hyaloplasme grâce à l'action d'une phosphatase alcaline. Cette hypothèse est encore renforcée par le fait que l'EDTA, ajouté à notre milieu d'incubation, empêche toute formation de précipité. On a montré que les plaquettes de la zone de vitellolyse, qui subissent une dégradation pendant la phase de régression, ne passaient pas par une étape intermédiaire morphologiquement observable alors que pour les stades antérieurs du développement, on peut observer des plaquettes à contenu hétérogène et les considérer comme une des étapes de la dégradation du vitellus (Vernier et Sire, 1977 a et b).

Qu'il s'agisse des processus d'extrusion ou de bourgeonnement, d'éclatement ou de compression, la plaquette qui subit ces processus se voit transformée en une autre plaquette, de plus petite dimension, mais de même structure morphologique homogène. Dans le hyaloplasme de la zone de vitellolyse, mise à part quelques mitochondries, les seuls éléments qui ont une

structure différente des plaquettes et qui semblent provenir de ces dernières, sont le β -glycogène et les granules osmio-
philes de nature certainement lipidique.

Zone cytoplasmique

Si les résultats morphologiques et cytologiques de la première partie de la CSV amenaient à la considérer comme une zone où s'effectue surtout la dégradation du vitellus, ceux concernant la partie cytoplasmique devaient s'interpréter de manière différente. En effet, l'organisation de cette couche cytoplasmique rappelle celle décrite pour "les cellules sécrétrices" (Caro et Palade, 1964; Jamieson et Palade, 1967 a et b; Morré et al., 1971; Flickinger, 1974 a et b; Slot et Geuze, 1974). Les organites qui, à la sortie de la zone de vitellolyse, se succèdent toujours dans le même ordre : REG et noyaux vitellins $\longrightarrow$ Golgi $\longrightarrow$ villosités font penser à attribuer une polarité à la zone cytoplasmique pendant la période de régression.

Le REG frappe par l'importance de ses travées et par ce quart de tour qu'il subit à la fin de la première moitié de la régression pour s'orienter perpendiculairement à la splanchnopleure. Lieu de la synthèse protéique (Palade et al., 1962; Caro et Palade, 1964; Jamieson et Palade, 1967 a et b; Siekevitz et Palade, 1958 a et b), le REG doit reprendre les éléments simples issus de la zone de vitellolyse et participer à l'élaboration soit de produits de sécrétion, soit de systèmes enzymatiques.

Dans cette optique, Walzer et Schönenberger (1973) démontraient l'incorporation d'uridine tritiée dans les noyaux vitellins et concluaient à une participation de ces noyaux à la synthèse des protéines.

L'appareil de Golgi, dans les cellules sécrétrices, a été démontré comme organite où les protéines sont rassemblées et transformées en granules sécrétoires (Siekevitz et Palade, 1958 a et b; Jamieson et Palade, 1967 a et b; 1968; 1971; Flickinger, 1974 a et b). Dans le cas de la CSV, il semble bien que l'appareil de Golgi joue ce rôle pour les VLDL (Vernier et Sire, 1975, 1976, 1977 a et b). Il semble aussi

assurer un rôle important dans l'élaboration d'hydrolases soit par ses vésicules de sécrétion, soit par le GERL-complex qui réagissent positivement après incubation à la β -glycérophosphatase acide.

L'aire de solubilisation, appelée ainsi parce que sa partie centrale est presque toujours dépourvue d'inclusions de type sécrétoire (Nittinger, 1967), doit permettre, par l'activité phosphatasique acide de l'appareil de Golgi, une ultime dégradation des inclusions sécrétoires de la CSV avant qu'elles ne se déversent dans la circulation vitelline. Cette aire de solubilisation doit aussi jouer un rôle énergétique important puisqu'elle contient de nombreuses mitochondries.

Pendant la régression, l'allongement progressif des villosités résulte de l'incorporation, à la membrane limitante des villosités, du matériel membranaire des inclusions sécrétoires qui se déversent dans l'espace périssplanchnique par exocytose.

Les inclusions observées dans la zone cytoplasmique soulignent encore son rôle sécrétoire.

Ce sont tout d'abord les lipoprotéines et plus particulièrement celles dénommées LTBD. Si chez les Mammifères, à la fois l'intestin et le foie sont à l'origine des triglycérides plasmatiques sous forme de lipoprotéines (Polonovski, 1975), il semblerait bien que la CSV joue, vis-à-vis des réserves vitellines, le même rôle que celui joué par la muqueuse intestinale vis-à-vis des lipides alimentaires. Dans un premier temps, la CSV forme des LTBD, puis ensuite des chylomicrons, deux inclusions qui sont acheminées vers l'embryon, via la circulation vitelline. Les corps cristallins, partiellement digérés par la pronase, représentent sans doute une production protéique. Ils apparaissent au moment où Ando (1965) a démontré l'utilisation la plus intensive du pool protéique. On peut alors s'imaginer que ces corps représentent une intervention active du REG avec décalage entre, d'une part une dégradation protéique intensive du vitellus coalescent et la reprise des produits de cette dégradation au niveau des ribosomes du réticulum,

et d'autre part le transport intracellulaire et le déversement de ce produit dans la circulation vitelline.

Les corps pseudovésiculaires sont difficiles à interpréter. Du fait de leur structure et de leur forte osmiophilie, on les considérerait volontiers comme structure lipo-protéique. Chez *Salmo gairdneri*, où l'on ne rencontre ni corps cristallins, ni structures pseudovésiculaires, on est tenté d'interpréter les lipochondries comme une combinaison des deux inclusions de *Salmo fario*. A la fois les fréquents contacts avec le REG, la forte osmiophilie, ainsi que surtout les figures d'empreintes digitales, laissent supposer une nature lipo-protéique de cette inclusion. Pour justifier son apparition, on peut lui appliquer la même explication que celle développée pour les corps cristallins de *Salmo fario*.

Les différentes activités enzymatiques testées, laissent entrevoir que les organites de la CSV élaborent eux-mêmes leurs propres systèmes enzymatiques.

La Phosphatase acide et la TPPase, utilisées comme marqueur de l'appareil de Golgi par Farquhar et al. (1974) lorsque cet organite est impliqué dans la synthèse de LTBD, sont observées dans la même disposition dans l'appareil de Golgi de la CSV. Les coated-vesicles, qui sont ACPases positives et qui fusionnent avec certaines vésicules de sécrétion, ont été aussi observées par Claude (1970), Dubois et Tachon (1974) et Vernier (1975). Ce phénomène est interprété comme apport d'hydrolases acides par la coated-vesicle aux vésicules de sécrétion. La rencontre de certaines vésicules de sécrétion avec des plaquettes vitellines peut poser le problème de la crinophagie (Smith et Farquhar, 1965; Farquhar, 1969, 1971), c'est-à-dire la destruction, par la CSV, de ses propres produits de sécrétion. Il semble donc que la CSV soit capable de régler sa propre production de LTBD en transformant certaines vésicules de sécrétion (probablement le surplus) en lysosomes secondaires.

L'observation d'une fusion entre des vésicules de sécrétion ACPase positives et des inclusions du type petites plaquettes vitellines supporte cette hypothèse.

D'après nos observations, on peut tracer la voie suivante de

l'utilisation de l'ACpase :

l'ACpase devient visiblement active dans le GERL-complex.

Elle passe ensuite dans les coated-vesicles.

De là, elle peut soit passer dans les vésicules de sécrétion en les transformant en lysosomes secondaires, soit se diriger tout de suite dans les plaquettes vitellines comme le suggèrent les observations de fusion directes entre coated-vesicles et plaquettes vitellines.

Les organites, qui réagissent à la détection de la peroxydase après uniquement fixation à la paraformaldéhyde sont difficiles à interpréter. Du fait de leur taille, de l'absence de corps cristallins, de leur relation avec le reticulum endoplasmique agranulaire, ces organites sont très proches des microperoxysomes décrits par Novikoff et al. (1972, 1973).

Cependant les microperoxysomes de l'intestin ou du foie de Rat (Novikoff et Novikoff, 1972; Novikoff et al., 1973) ne sont pas inhibés par la fixation à la glutaraldéhyde. Si Herzog et Fahimi (1974, 1976) ont démontré que le traitement du tissu à la glutaraldéhyde était nécessaire pour mettre en évidence l'activité peroxydasique de la catalase, ils étaient d'accord qu'un tel traitement inhibait l'activité catalasique de la catalase et celle de la peroxydase. La première explication possible serait alors de considérer, dans ce travail, une réponse de type catalasique de la catalase et une participation de celle-ci à l'élimination du peroxyde d'hydrogène qui pourrait être généré par des voies métaboliques telles que xanthine oxydase, L- et D- amino acides oxydases ou glucose oxydase (Lehninger, 1971). Cette réponse de type catalasique est encore soulignée par l'inhibition de l'aminotriazole sur ces organites. Toutefois, la répartition de ces organites surtout autour des noyaux vitellins pourrait suggérer qu'il existe une relation avec la voie du gluconate pour permettre l'élaboration des riboses nécessaires aux acides nucléiques. Dans cette optique, la démonstration de la glucose-6-phosphate déshydrogénase, dans la CSV, confirme cette vue.

Un point délicat à discuter est la présence, dans la zone cytoplasmique, de plaquettes vitellines et de leur marquage après incubation à la ACpase.

Il ne fait aucun doute que des plaquettes peuvent parvenir dans la zone cytoplasmique. Ce phénomène est bien observable, pendant la régression, pour les plaquettes qui ont un diamètre plus grand que 1μ . On ne peut guère les confondre avec d'autres structures et on peut suivre les images de dégradation excessivement complexes qu'elles développent entre les travées du REG. Toutefois lorsque le diamètre des plaquettes vitellines devient plus petit que 1μ (surtout entre $0,2$ et $0,5 \mu$), la confusion avec d'autres inclusions devient problématique. En effet, dans l'hypothèse d'une zone cytoplasmique sécrétoire, comment reconnaître, par exemple, une plaquette vitelline de $0,3 \mu$ et un granule de sécrétion de même diamètre et présentant la même texture aux électrons?

Il faut donc garder à l'esprit cette double origine possible puisque, dans ce travail, toutes les inclusions de la couche cytoplasmique moyennement denses aux électrons et d'un diamètre inférieur à 1μ ont été appelées petites plaquettes. Toutefois, que l'inclusion soit envisagée comme véritable plaquette vitelline ou comme granule sécrétoire, il ne fait aucun doute que la plupart des éléments constitutifs macromoléculaires de cette structure proviennent de la même source : le vitellus coalescent.

Dans leur recherche de mise en évidence d'une activité phosphatasique acide, sur des stades précédant l'éclosion, Vernier et Sire (1977 b) démontrent que seules les plaquettes superficielles du syncytium vitellin révèlent une activité positive. Après l'éclosion, nous confirmons cette observation pour les grandes plaquettes hétérogènes qui pénètrent dans la zone cytoplasmique et aussi pour certaines petites plaquettes de cette même zone. Toutefois, avec le milieu d'incubation utilisé, nous n'avons jamais observé de réaction positive sur les plaquettes grandes ou petites lorsqu'elles sont homogènes. Il faut toujours que celles-ci présentent soit une vacuolisation, soit un enroulement membranaire. Par contre, dans des expériences préliminaires où nous avons employé le tampon acétate à la place du tampon maléate, des plaquettes homogènes de la zone cytoplasmique présentaient une réaction positive, tout à fait semblable à ce que Vernier et Sire (1977 b) ont pu

observer en employant, eux, le tampon cacodylate.

Il est donc possible que le tampon du milieu d'incubation puisse modifier les résultats cytologiques en agissant, par exemple, sur le développement ultérieur des cristaux de phosphate de plomb.

La localisation de phosphatases acides sur certaines grandes et petites plaquettes de la zone cytoplasmique amène à revoir leur dénomination. Si l'on s'en tient à la nomenclature de Duve et Wattiaux (1966), il serait plus judicieux de considérer ces plaquettes comme lysosomes secondaires ou autolysosomes et, suivant le stade de dégradation, comme corps résiduels.

Décharge des produits issus du vitellus dans la circulation

La fusion de la membrane des inclusions de type plaquettes vitellines et de vacuoles granulaires avec la membrane plasmique des villosités tend à souligner un passage de ces produits vitellins par émiocytose (Lacy et Hartoft, 1959; Farquhar, 1961; Salazar et Peterson, 1964). Si Amherdt (1974) démontrait que dans le pancréas ce processus était couplé à une endocytose, nous n'avons pas retrouvé cette modalité pour la CSV après utilisation de la technique d'incubation à la peroxydase de raifort. L'absence d'endocytose explique l'allongement du système microvillositaire dû certainement à l'incorporation de matériel membranaire des deux inclusions déjà citées à la membrane plasmique des villosités.

De l'espace périsplanchnique, les produits vitellins, pour atteindre le lumen des vaisseaux, doivent franchir la paroi vasculaire.

Dans le cas des petits capillaires, cette paroi, du côté des villosités, n'est composée que d'un endothélium qui présente à la fois des discontinuités et des fenestrations. Chez les Mammifères, Rhodin (1973) a montré que ces spécialisations permettaient un passage immédiat des substances devant franchir ce genre d'endothélium.

Pour les gros vaisseaux, la constitution de la paroi en double couche ne semble pas un obstacle au passage de matériel vitellin. Nos expériences avec la peroxydase de raifort mon-

trent que les jonctions cellulaires sont perméables à toutes les molécules d'un poids moléculaire égal ou inférieur à 40.000 (le PM de la peroxydase de raifort = 40.000). D'autre part le dépôt de "noir d'osmium" dans les vésicules de micropinocytose des cellules splanchniques suggère un transport intracellulaire (Rhodin, 1973; Karnovsky, 1967) pour les grosses molécules. Cette possibilité est encore renforcée par le marquage du Golgi des cellules splanchniques après incubation à la TPPase, puisque Goldfisher et al. (1964), Novikoff (1965), Torack et Barnett (1964), De The (1968), Kessel et Decker (1971) lient la présence de la TPPase dans les épithelia à un passage possible de substances à travers cette couche et ses membranes. Dans la veine vitelline et les vaisseaux adjacents, la présence de grands faisceaux de microfilaments dans les cellules splanchniques ainsi que de nombreuses microvésicules semble indiquer une différenciation vers un type de cellules musculaires lisses.

Si le vitellus des Poissons est constitué de protéines spécifiques telles que lipovitelline et phosvitine (Jared et Wallace, 1968; Tria et Scanu, 1969; Markert et Vanstone, 1971; Amirante, 1972), il faut que ces réserves soient transformées pour être utilisables par l'embryon. Cette transformation semble se réaliser en grande partie dans la couche syncytiale vitelline où son organisation en deux zones, l'une surtout impliquée dans la dégradation du vitellus, l'autre de type sécrétoire, tend à confirmer cette manière de voir. Avec Vernier et Sire (1977 a et b), nous serions très tentés de considérer la couche syncytiale vitelline comme une muqueuse intestinale dont la seule source alimentaire serait le vitellus coalescent.

BIBLIOGRAPHIE

- AMHERDT, M.H.: Modifications ultrastructurales du pancréas endocrine chez les rongeurs atteints de troubles du métabolisme glucidique. Thèse. Faculté des Sciences. Université de Genève. 1974.
- AMIRANTE, G.A.: Immunochemical studies on rainbow trout lipovitelin. *Acta Embryol. Exp.*, 373-383 (1972) Supp.
- ANDERSON, P.J.: Purification and quantitation of glutaraldehyde and its effect on several enzyme activities in skeletal muscle. *J. Histochem. Cytochem.* 15, 652-661 (1967)
- ANDO, K.: Ultracentrifugal analysis of yolk proteins in rainbow trout and their changes during development. *Can. J. Biochem.* 43, 373-379 (1965)
- BALINSKY, B.I.: An introduction to embryology. pp 1-725, third edition. W.B. Saunders Company 1970.
- BALLARD, W.W.: The role of the cellular envelope in the morphogenetic movements of teleost embryos. *J. Exp. Zool.* 161, 193-200 (1966 a)
- BALLARD, W.W.: Origin of the hypoblast in *Salmo*. I. Does the blastodisc edge turn inward? *J. Exp. Zool.* 161, 201-210 (1966 b)
- BALLARD, W.W.: Item II. Outward movements of deep central cells. *J. Exp. Zool.* 161, 211-220 (1966 c)
- BALLARD, W.W.: Normal embryonic stages for salmonid fishes, based on *Salmo gairdneri* (R) and *Salvelinus fontinalis* (M). *J. Exp. Zool.* 184, 7-26 (1973 a)
- BALLARD, W.W.: Morphogenetic movements in *Salmo gairdneri* (R). *J. Exp. Zool.* 184, 27-48 (1973 b)
- BALLARD, W.W.: A new fate map for *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Zool.* 184, 49-74 (1973 c)
- BALLARD, W.W., DODES, L.M.: The morphogenetic movements at the lower surface of the blastodisc in salmonid embryos. *J. Exp. Zool.* 168, 67-84 (1968)
- BARKA, T., ANDERSON, P.J.: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* 10, 741-753 (1962)

- BEARD, M.E., NOVIKOFF, A.B.: Distribution of peroxisomes (microbodies) in the nephron of the rat: a cytochemical study. *J. Cell Biol.* 42, 501-518 (1969)
- BOWES, J.A., CATER, C.W.: The interaction of aldehydes with collagen. *Biochem. Biophys. Acta* 168, 341-352 (1968)
- CARO, L.G., PALADE, G.E.: Protein synthesis, storage, and discharge in the pancreatic exocrine cell. An autoradiographic study. *J. Cell Biol.* 20, 473-495 (1964)
- BUSSON-MABILLOT, S.: Influence de la fixation chimique sur les ultrastructures. I. Etude sur les organites du follicule ovarien d'un poisson téléostéen. *J. Microscopie* 12, 317-348 (1971)
- BUSSON-MABILLOT, S.: Item II. Etude sur les enclaves de nature chimique variée de l'ovocyte d'un poisson téléostéen. *J. Microscopie* 13, 173-192 (1972)
- CLAUDE, A.: Growth and differentiation of cytoplasmic membranes in the course of lipoprotein granule synthesis in the hepatic cell. I. Elaboration of elements of the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 47, 745-766 (1970)
- DE DUVE, C., WATTIAUX, R.: Function of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.* 28, 435-492 (1966)
- DE THE, G.: Ultrastructural cytochemistry of the cellular membranes. In : *Ultrastructure in biological systems: the membranes* (A.J. Dalton and F. Hagueneau, eds.), pp. 121-150. New-York : Academic Press 1968
- DEVILLERS, C.: Structural and dynamic aspects of the development of the teleostean egg. In : *Advances in morphogenesis* (M. Abercrombie and J. Brachet, eds.), pp. 379-428. New-York : Academic Press 1961
- DROCHMANS, P.: Morphologie du glycogène. Etude au microscope électronique de colorations négatives du glycogène. *J. Ultrastruct. Res.* 6, 141-163 (1962)
- DUBOIS, A.M.: Précis de techniques histologiques. *Inst. d'hist. normale et d'embryol. générale. Ecole de Médecine de Genève*, pp. 1-96. 1966
- DUBOIS, P., TACHON, G.: "GERL-complex", lysosomes et grains de sécrétion au cours de la différenciation cellulaire

- dans une glande endocrine chez l'homme: l'antéhypophyse foetale. *J. Microscopie* 19, 253-264 (1974)
- DUPOIS, J.: La tératogenèse germinale mâle des gastéropodes et ces rapports avec l'oogenèse atypique et la formation des oeufs nourriciers. *Arch. Zool. Exp. Gén.* 103, 217-368 (1964)
- ERNST, S.A., PHILPOTT, C.W.: Preservation of Na-K-activated and Mg-activated ATPase activities of avian salt gland and teleost gill with formaldehyde as fixative. *J. Histochem. Cytochem.* 18, 251-263 (1970)
- FARQUHAR, M.G.: Fine structure and function in capillaries of anterior pituitary gland. *Angiology* 12, 270-279 (1961)
- FARQUHAR, M.G.: Lysosomes function in regulatory secretion disposal of secretory granules in cells of the anterior pituitary gland. In : *Lysosomes in biology and pathology* (J.T. Dingle and H.B. Fell, eds.), pp. 462-481. Amsterdam : North Holland 1969
- FARQUHAR, M.G.: Processing of secretory product by cells of the anterior pituitary gland. In : *Subcellular organization and function in endocrine tissues* (H. Heller and K. Lederis, eds.), pp. 79-124. Cambridge : Cambridge University Press 1971
- FARQUHAR, M.G., BERGERON, J.J.M., PALADE, G.E.: Chemistry of Golgi fractions prepared from rat liver. *J. Cell Biol.* 60, 8-25 (1974)
- FAVARD, P.: The Golgi apparatus. In : *Handbook of molecular cytology* (A. Lima de Faria, ed.), pp. 1130-1155. Amsterdam : North Holland 1969
- FLICKINGER, C.J.: Synthesis, intracellular transport, and release of secretory protein in the seminal vesicle of the rat, as studied by electron microscope radioautography. *Anat. Rec.* 180, 407-426 (1974 a)
- FLICKINGER, C.J.: Protein secretion in the rat ventral prostate and the relation of Golgi vesicles, cisternae and vacuoles, as studied by electron microscope radioautography. *Anat. Rec.* 427-448 (1974 b)

- GABE, M.: Techniques histologiques. Masson et Cie, ed., pp. 1-1113. 1968
- GOLDFISHER, S., ESSNER, E., NOVIKOFF, A.B.: The localization of phosphatase activities at the level of ultra-structure. J. Histochem. Cytochem. 12, 72-85 (1964)
- GRAHAM, R.C., KARNOVSKY, M.J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxydase in the proximal tubules of mouse kidney : ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem. 14, 291-302 (1966)
- GRAY, J.: The growth of fish. I. The relationship between embryo and yolk in salmo fario. J. Exptl. Biol. 4, 215-225 (1926)
- GUDE, W.D.: Autoradiographic techniques. Localization of radio-isotopes in biological material. Englewood Cliffs, New-Jersey : Prentice Hall 1968
- HELMINEN, H.J., ERICSSON, J.L.E.: On the mechanism of lysosomal enzyme secretion. Electron microscopic and histochemical studies on epithelial cells of the rat's ventral prostate lobe. J. Ultrastruct. Res. 33, 528-549 (1970)
- HERZOG, V., FAHIMI, H.D.: Colorimetric and cytochemical studies for determination of optimal conditions for demonstration of catalase. In : Electron microscopy and cytochemistry (E. Wise, W. Th. Daems, I. Molenaar, P. Van Duijn, eds.), pp. 111-113. Amsterdam : North Holland 1974
- HERZOG, V., FAHIMI, H.D.: Intracellular distinction between peroxidase and catalase in exocrine cells of rat lacrimal gland: a biochemical study. Histochemistry 46, 273-286 (1976)
- HOLT, S.J.: Ultrastructural localization of enzymes using osmophilic principles. In : Electron microscopy and cytochemistry (E. Wise, W. Th. Daems, I. Molenaar, P. Van Duijn, eds.), pp. 71-83. Amsterdam : North Holland 1974
- HOPWOOD, D.: Some aspects of fixation with glutaraldehyde. A biochemical and histochemical comparison of the effects of formaldehyde and glutaraldehyde fixation

- on various enzymes and glycogen with a note on penetration of glutaraldehyde into liver. *J. Anat.* 101, 83-92 (1967)
- HOPWOOD, D.: A comparison of the crosslinking abilities of glutaraldehyde, formaldehyde and α -hydroxydipaldehyde with bovine serum albumin and casein. *Histochemie* 17, 151-161 (1969)
- HOPWOOD, D.: Theoretical and practical aspects of glutaraldehyde fixation. *Histochem. J.* 4, 267-303 (1972)
- HOPWOOD, D.: Recent advances in fixation of tissues. In: *Electron microscopy and cytochemistry* (E. Wise, W.Th. Daems, I. Molenaar, P. Van Duijn, eds.), pp. 367-381. Amsterdam: North Holland 1974
- HUGON, J., BORGER, M.: A direct lead method for the electron microscopic visualization of alkaline phosphatase activity. *J. Histochem. Cytochem.* 14, 429-431 (1966)
- JAMIESON, J.D., PALADE, G.E.: Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. I. Role of the peripheral elements of the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 34, 577-596 (1967 a)
- JAMIESON, J.D., PALADE, G.E.: Item II. Transport to condensing vacuoles and zymogen granules. *J. Cell Biol.* 34, 597-615 (1967 b)
- JAMIESON, J.D., PALADE, G.E.: Item IV. Metabolic requirements. *J. Cell Biol.* 39, 589-603 (1968)
- JARED, D.W., WALLACE, R.A.: Comparative chromatography of the yolk proteins of teleost. *Comp. Biochem. Physiol.* 24, 437-443 (1968)
- JONES, D.: Reactions of aldehydes with unsaturated fatty acids during histological fixation. *Histochem. J.* 4, 421-465 (1972)
- JURAND, A., SELMAN, G.G.: Yolk utilization in the notochord of newt as studied by electron microscopy. *J. Embryol. Exptl. Morphol.* 12, 43-53 (1964)
- KALT, R.K., TANDLER, B.: A study of fixation of early amphibian embryos for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 36, 633-645 (1971)

- KARASAKI, S.: Studies on amphibian yolk. I. The ultrastructure of the yolk platelet. *J. Cell Biol.* 18, 135-151 (1963)
- KARNOVSKY, M.J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137A-138A (1965)
- KARNOVSKY, M.J.: The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxydase as a tracer. *J. Cell Biol.* 35, 213-236 (1967)
- KESSEL, R.G., DECKER, R.S.: Cytodifferentiation in the *Rana pipiens* oocyte. *J. submicr. Cytol.* 2, 239-253 (1971)
- KUNZ, Y.: Morphologische Studien über die embryonale und post-embryonale Entwicklung bei Teleostiern mit besonderer Berücksichtigung des Dottersystems und der Leber. *Rev. Suisse Zool.* 71, 445-525 (1964)
- LACY, P.E., HARTOFT, W.S.: Electron microscopy of the islets of Langerhans. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 82, 287-294 (1959)
- LAMBSON, R.O.: An electron microscopic study of the entodermal cells of the yolk sac of the chick during incubation and after hatching. *Am. J. Anat.* 129, 1-20 (1970)
- LEHNINGER, A. L.: Biochemistry. New-York : Worth Publishers, Inc. 1971
- LENTZ, T.L., TRINKAUS, J.P.: A fine structural study of cytodifferentiation during cleavage, blastula, and gastrula stages of *Fundulus heteroclitus*. *J. Cell Biol.* 32, 121-138 (1967)
- LUFT, J.H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 409-414 (1961)
- LUFT, J.H.: Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.* 171, 347-368 (1971 a)
- LUFT, J.H.: Item II. Fine structural localization in animal tissues. *Anat. Rec.* 171, 369-416 (1971 b)
- LUFT, J.H.: Item III. Fine structure of the plasma membrane and extraneous coats in amoebae. *Anat. Rec.* 171, 417-442 (1971 c)
- MALCOM LOVE R.: The chemical biology of fishes. pp. 60-128. New-York : Academic Press 1970

- MANFREDI-ROMANINI, M.G., FRASCHINI, A., PORCELLI, F.: Enzymatic activities during the development and the involution of the yolk sac of the trout. *Ann. Histochem.* 14, 315-324 (1969)
- MARKERT, J.R., VANSTONE, W.E.: Egg proteins of coho salmon : chromatographic separation and molecular weights of the major proteins in the high density fraction and their presence in salmon plasma. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 28, 1853-1856 (1971)
- McCAY, C.M., TUNISON, C.M., CROWELL, M., PAUL, H.: The calcium and phosphorus content of the body of the brook trout in relation to age, growth, and food. *J. Biol. Chem.* 114, 259-263 (1936)
- MEIJER, A.E.F.H.: Semipermeable membranes for improving the histochemical demonstration of enzyme activities in tissue sections. I. Acid phosphatase. *Histochemie* 30, 31-39 (1972)
- MEIJER, A.E.F.H.: Item IV. Glucose-6-phosphatedehydrogenase and 6-phosphogluconatedehydrogenase. *Histochemistry* 40, 349-359 (1974)
- MILLER, F., PALADE, G.E.: Lytic activation in renal protein absorption droplets. *J. Cell Biol.* 23, 519-552 (1964)
- MOLLENHAUER, H.H., WHALEY, W.G.: An observation on the functioning of the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 17, 222-225 (1963)
- MONNERON, A., BERNHARD, W.: Action de certaines enzymes sur des tissus inclus en épon. *J. Microscopie* 5, 697-714 (1966)
- MORRE, D.J., MOLLENHAUER, H.H., BRACKER, C.E.: Origin and continuity of Golgi apparatus. In : Results and problems in cell differentiation, vol. II. Origin and continuity of cell organelles (J. Reinert, H. Ursprung, eds.), pp. 82-126. New-York : Springer-Verlag 1971
- NITTINGER, J.: Histologische und histochemische Untersuchungen über die Involution des Dottersacks bei *Lebistes reticulatus* Peters und *Salmo irideus* Gibb. *Zool. Jb. Anat. Bd.* 85, 245-325 (1967)
- NOVIKOFF, A.B.: Enzymatic activities and functional interrelations of cytomembranes. In : Intracellular mem-

- braneous structures (S. Seno, E.V. Cowdry, eds.), pp. 277-291. Okayama : Japan Society for Cell Biology 1965
- NOVIKOFF, A.B., NOVIKOFF, P.M., DAVIS, C., QUINTANA, N.: Studies on microperoxisomes. II. A cytochemical method for light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 20, 1006-1023 (1972)
- NOVIKOFF, P.M., NOVIKOFF, A.B., QUINTANA, N., HAUW, J.J.: Golgi apparatus, GERL, and lysosomes of neurons in rat dorsal root ganglia, studied by thick section and thin section cytochemistry. *J. Cell Biol.* 50, 859-886 (1971)
- NOVIKOFF, P.M., NOVIKOFF, A.B.: Peroxisomes in absorptive cells of mammalian small intestine. *J. Cell Biol.* 53, 532-560 (1972)
- NOVIKOFF P.M., NOVIKOFF, A.B., QUINTANA, N., DAVIS, C.: Studies on microperoxisomes. III. Observations on human and rat hepatocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 21, 540-558 (1973)
- OPPENHEIMER, J.M.: Organization of the teleost blastoderm. *Quart. Rev. Biol.* 22, 105-118 (1947)
- OVTRACHT, L., THIERY, J.-P.: Mise en évidence par cytochimie ultrastructurale de compartiments physiologiquement différents dans un même saccule golgien. *J. Microscopie* 15, 135-170 (1972)
- PALADE, G.E., SIEKEWITZ, P., CARO, L.G.: Structure, chemistry and function of the pancreatic exocrine cell. In : Ciba Foundation Symposium on the Exocrine Pancreas (G.E.W. Wolstenholme and C.M. O'Connor, eds.), pp. 23-49. London : Churchill Ltd. 1962
- PENTILLA, A., KALIMO, H., TRUMP, B.F.: Influence of glutaraldehyde and / or osmium tetroxide on cell volume, ion content, mechanical stability, and membrane permeability of Ehrlich Ascites tumor cells. *J. Cell Biol.* 63, 197-214 (1974)
- PHILIPS, A.M., PODOLIAK, H.A., DUMAS, R.F., THOESSEN, R.W.: The nutrition of trout. *Fish. Res. Bull.* 22, 52-202 (1958)

- QUIOCHO, F.A., RICHARDS, F.M.: Intermolecular crosslinking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase -A. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 52, 833-838 (1964)
- QUIOCHO, F.A., RICHARDS, F.M.: The enzymic behaviour of carboxypeptidase -A in the solid state. *Biochem.* 5, 4062-4076 (1966)
- POLONOVSKI, J.: Métabolisme des triglycérides plasmatiques. *C.R. Soc. Biol.* 169, 1129-1144 (1975)
- RASMUSSEN, K.E.: Fixation in aldehydes. A study on the influence of the fixative, buffer, and osmolarity upon the fixation of the rat retina. *J. Ultrastruct. Res.* 46, 87-102 (1974)
- REVEL, J.P., KARNOVSKY, M.J.: Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.* 33, C7 (1967)
- REYNOLDS, E.S.: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-212 (1963)
- RHODIN, J.A.G.: Ultrastructure of the microvascular bed. In : *The microcirculation in clinical medicine* (Roe Wells, ed.), pp. 13-31. London and New-York : Academic Press 1973
- RICHARDSON, K.C., JARETT, L., FINKE, E.H.: Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.* 35, 313-323 (1960)
- SAGE, J.A., JERSILD, Jr. R.A.: Comparative distribution of carbohydrates and lipids droplets in the Golgi apparatus of intestinal absorptive cells. *J. Cell Biol.* 51, 333-338 (1971)
- SALAZAR, H., PETERSON, R.R.: Morphologic observations concerning the release and transport of secretory products in the adenohypophysis. *Am. J. Anat.* 115, 199-223 (1964)
- SCHEJTER, A., BAR-ELI, A.: Preparation and properties of cross-linked water-insoluble catalase. *Arch. Biochem. Biophys.* 136, 325-330
- SCHREVEL, J., BESSE, C., VIVIER, E., ORMIERES, R.: Etude ultrastructurale et cytochimique d'inclusions à structure

- périodique dans les cavités du reticulum endoplasmique de Grégarines. J. Microscopie 21, 31-42 (1974)
- SEILIGMAN, A.M., KARNOVSKY, M.J., WASSERKRUG, H.L., HANKER, J.S.: Non droplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxydase activity with a polymerizing osmophilic reagent diaminobenzidine (DAB). J. Cell Biol. 38, 1-14 (1968)
- SIEKEVITZ, P., PALADE, G.E.: A cytochemical study on the pancreas of the guinea pig. I. Isolation and enzymatic activities of the cell fractions. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 203-218 (1958 a)
- SIEKEVITZ, P., PALADE, G.E.: Item II. Functional variations in the enzymatic activity of microsomes. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 309-318 (1958 b)
- SLOT, J.W., GEUZE, J.J., POORT, C.: Synthesis and intracellular transport of proteins in the exocrine pancreas of the frog (*Rana esculenta*). I. An ultrastructural and autoradiographic study. Cell Tiss. Res. 155, 135-154 (1974)
- SLOT, J.W., GEUZE, J.J., POORT, C.: Item II. An in vitro study of the transport process and the influence of temperature. Cell Tiss. Res. 167, 147-165 (1976)
- SMITH, S.: Early development and hatching. In : The physiology of fishes (M.E. Brown, ed.), pp. 323-359. New-York : Academic Press 1957
- SMITH, R.E., FARQUHAR, M.G.: Preparation of non-frozen sections for electron microscope cytochemistry. RCA Sci. Instr. News 10, 13-18 (1965)
- SMITH, R.E., FARQUHAR, M.G.: Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland. J. Cell Biol. 31, 319-347 (1966)
- SPURR, A.R.: A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26, 31-43 (1969)
- TACHIBANA, T.: Comparative ultrahistochemistry of the adepidermal granules of *Salmo irideus*, *Lebistes reticulatus* and *Hynobius tokyoensis*. Enzyme digestive experiment for the epoxy-embedded sections. J. Histochem. Cytochem. 23, 289-294 (1975)

- THIERY, G.: Mise en évidence des phosphatases alcalines dans les cellules animales par la technique au baryum. *J. Microscopie* 21, 253-258 (1974)
- THIERY, J.-P.: Mise en évidence de polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie* 6, 987-1017 (1967)
- TORACK, R.M., BARNETT, R.J.: The fine structural localization of nucleoside phosphatase activity in the blood-brain barrier. *J. Neuropath. Exptl. Neurol.* 23, 46-59 (1964)
- TRIA, E., SCANNU, A.M.: Structural and functional aspect of lipoproteins in living systems. London : Academic Press 1969
- TRINKAUS, J.-P.: A study of the mechanism of epiboly in the egg of fundulus heteroclitus. *J. Exp. Zool.* 118, 269-319 (1951)
- TRINKAUS, J.-P.: Morphogenetic cell movements. In : Major problems of developmental biology (M. Locke, ed.), 25 th. symp. soc. develop. biol. pp. 125-176. New-York : Academic Press 1966
- TRINKAUS, J.-P.: The role of the periblast in fundulus epiboly. *Ontogenesis* 2, 401-405 (1971)
- TRINKAUS, J.-P. Surface activity and locomotion of fundulus deep cells during blastula and gastrula stages. *Develop. Biol.* 30, 68-103 (1973)
- VAN DER GHINST, M.: Mise en évidence de ferments dans le syncytium vitellin de la truite. *Bull. hist. phys. et path. de tech. micros.* 12, 257-258 (1935)
- VERNIER, J.-M.: Etude ultrastructurale des lipoprotéines hépatiques de très basse densité au cours du développement de la truite arc-en-ciel, salmo gairdneri R. *J. Microscopie* 23, 39-50 (1975)
- VERNIER, J.-M., SIRE, M.-F.: Lipoprotéines de très basse densité et glycogène dans le syncytium vitellin, l'épithélium intestinal et le foie, aux stades précoces du développement embryonnaire chez la truite arc-en-ciel. *Biol. Cellulaire* 29, 45-54 (1977 a)

- VERNIER, J.-M., SIRE, M.-F.: Plaquettes vitellines et activité hydrolasique acide au cours du développement embryonnaire de la truite arc-en-ciel. Etude ultrastructurale et biochimique. Biol. Cellulaire 29, 99-112 (1977 b)
- WALZER, C., SCHONENBERGER, N.: Sur le développement du périblaste de l'alevin de truite, *Salmo gairdneri* (R.). Etude ultrastructurale et autoradiographique. Rev. Suisse Zool. 80, 691-693 (1973)
- WARD, R.T.: The origin of protein and fatty yolk in *Rana pipiens*. Electronmicroscopical and cytochemical observation of young and mature oocytes. J. Cell Biol. 14, 309-341 (1962)
- WILLIAMS, J.: Yolk utilization. In : The biochemistry of animal development (R. Weber, ed.), vol. 2, pp. 341-377. New-York : Academic Press 1967
- WOURMS, J.P.: Developmental biology of annual fishes. I. Stages in the normal development of *Austrofundulus myersi*. J. Exp. Zool. 182, 143-168 (1972)
- YAMAGAMI, K.: Phosphorus metabolism in fish egg. I. Changes in the contents of some phosphorus compounds during early development of *Oryzias latipes*. Scient. Pap. Col. Gen. Educ. Univ. Tokyo 10, 99-108 (1960 a)
- YAMAGAMI, K.: Item II. Transfer of some phosphorus compounds from egg yolk into embryonic tissues in *Salmo irideus* during development. Scient. Pap. Col. Gen. Educ. Univ. Tokyo 10, 325-336 (1960 b)
- YAMAMOTO, M.: Electron microscopy of fish development. V. The fine structure of the periblast in *Oryzias latipes*. J. Fac. Sci., Univ. Tokyo, Sec IV 10, 483-490 (1967)

